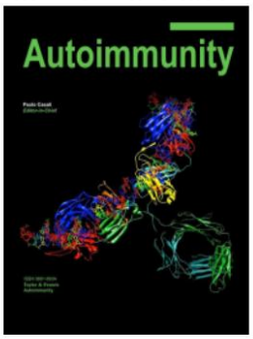
Machine Translated by Google



Autoimmunitet

ISSN: 0891-6934 (Trykt) 1607-842X (Online) Tidsskriftets hjemmeside: www.tandfonline.com/journals/iaut20

Kvantificering af resterende plasmid-DNA og SV40-promotor-enhancer-sekvenser i Pfizer/BioNTech- og Moderna modRNA COVID-19-vacciner fra Ontario, Canada

David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan

For at citere denne artikel: David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan (2025) Kvantificering af restplasmid-DNA og SV40-promotor-enhancer-sekvenser i Pfizer/BioNTech- og Moderna modRNA COVID-19-vacciner fra Ontario, Canada, Autoimmunity, 58:1, 2551517, DOI: 10.1080/08916934.2025.2551517

For at linke til denne artikel: https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517

© 2025 Forfatteren(e). Udgivet af Informa UK Limited, der driver virksomhed som Taylor & Francis Group

Se supplerende materiale

Udgivet online: 06. september 2025.

Indsend din artikel til dette tidsskrift

Artikelvisninger: 66448

Se relaterede artikler

Se Crossmark-data

Citerende artikler: 1 Se citerende artikler

De fulde vilkår og betingelser for adgang og brug kan findes på https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iaut20

Machine Translated by Google

Autoimmunitet
2025, BIND 58, NR. 1, 2551517
https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Forskningsartikel

OPEN ACCESS Check for updates

Kvantificering af resterende plasmid-DNA og SV40-promotor-enhancer-sekvenser i Pfizer/BioNTech og Moderna modRNA COVID-19-vacciner fra Ontario, Canada

David J. Speichera , Jessica Roseb og Kevin McKernanc

a Institut for Patobiologi, University of Guelph, Guelph, ON, Canada; b Uafhængig forsker, Ontario, Canada; c Medicinsk Genomik, Beverly, MA, USA

ABSTRAKT

For nogle af de COVID-19-vacciner blev de lægemiddelstoffer, der blev frigivet på markedet, fremstillet anderledes end dem, der blev brugt i kliniske forsøg. Fremstilling af nukleosidmodificeret mRNA (modRNA) til kommercielle COVID-19-vacciner er afhængig af RNA. polymerase-transkription af en plasmid-DNA-skabelon. Tidligere undersøgelser har identificeret høje niveauer af plasmid-DNA i hætteglas med modRNA-vacciner, hvilket tyder på, at fjernelse af resterende DNA-skabelon er problematisk. Derfor kvantificerede vi DNA-mængden i et begrænset antal Pfizer-BioNTech- og Moderna COVID-19 modRNA-vaccinehætteglas ved hjælp af to uafhængige metoder. Totalt DNA og specifikke DNA-mål blev kvantificeret ved henholdsvis Qubit-fluorometri og kvantitativ polymerasekædereaktion (qPCR) på 32 hætteglas, der repræsenterede 16 unikke vaccinepartier. RNase A-behandling blev brugt til at vurdere virkningen af RNA-krydstale i DNA-fluorometri. En foreløbig vurdering af DNA-fragmentlængde og DNase I-følsomhed blev også udført. Totalt DNA varierede fra 371-1.548 ng/dosis og 1.130-6.280 ng/dosis i henholdsvis Pfizer- og Moderna-produkter. Specifikt DNA for flere plasmid-DNA-mål varierede fra 0,22-7,28 ng/dosis for Pfizer og 0,01-0,78 ng/dosis for Moderna. SV40-promotor-enhancer-ori (0,25-23,72 ng/dosis) blev kun detekteret i Pfizer-hætteglas. Oxford Nanopore-sekventering af ét hætteglas fandt gennemsnitlig og maksimal DNA-værdi. fragmentlængder på henholdsvis 214 bp og 3,5 kb. Disse data viser tilstedeværelsen af 1,23×108 til 1,60×1011 plasmid-DNA-fragmenter pr. dosis indkapslet i lipid-nanopartikler. Ved hjælp af fluorometri oversteg det samlede DNA i alle testede hætteglas den regulerede grænse for resterende DNA, der er fastsat af den amerikanske fødevare- og lægemiddeladministration (FDA) og Verdenssundhedsorganisationen (WHO), med 36-153 gange for Pfizer og 112-627 gange for Moderna efter at have taget højde for uspecifik binding til modRNA. Ved test med qPCR var alle Moderna-hætteglas inden for den regulerede grænse, men 2/6 Pfizer-partier (3 hætteglas) oversteg den regulerede grænse for SV40-promotor-enhancer-ori med 2 gange. Tilstedeværelsen af SV40-promotor-enhancer-elementet i Pfizer-hætteglas giver anledning til betydelige sikkerhedsproblemer. Denne undersøgelse understreger vigtigheden af metodologiske overvejelser ved kvantificering af resterende plasmid-DNA i modRNA-produkter, i betragtning af øget LNP-transfektionseffektivitet, og kumulativ dosering udgør betydelige og ukvantificerede risici for menneskers sundhed.

ARTIKELHISTORIK

Modtaget 16. april 2025
Revideret 16. juli 2025
Accepteret 10. august 2025

NØGLEORD

COVID-19; vaccine; modRNA; mRNA; resterende DNA; DNA-kontaminering

Indledning

Kemisk syntese af stort RNA (>200 bp) er dyrt og fejlbehæftet. Derfor bruges en T7-polymerase til at generere lange modificerede RNA'er (modRNA) fra DNA-skabeloner. DNA-skabeloner er lettere at syntetisere, men skal fjernes fra det endelige lægemiddelprodukt. På grund af begrænsningerne ved kemisk syntese af DNA syntetiseres fragmenter eller oligoer af DNA først kemisk, sammenføjes med enzymatisk ligering og polymerisering og klones endelig ind i replikationskompetente plasmider som deres produkter i fuld længde. Oprensning af plasmid-DNA fra Escherichia coli (E. coli) kan udføres ved direkte lysis af E. coli og plasmid-DNA-oprensning eller ved oprensning via polymerasekædereaktion (PCR) af det målrettede plasmidindsæt. Disse to forskellige oprensningsmetoder kan have...

KONTAKT David J. Speicher speicher@uoguelph.ca, research@davidspeicher.com 50 Stone Rd E, Guelph, ON N1G 2W1, Canada. Institut for Patobiologi, University of Guelph,

Supplerende data til denne artikel kan findes online på https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517.

Denne artikel er blevet rettet med mindre ændringer. Disse ændringer påvirker ikke artiklens akademiske indhold.

© 2025 Forfatteren(e). Udgivet af Informa UK Limited, der driver virksomhed som Taylor & Francis Group

Dette er en Open Access-artikel, der distribueres under vilkårene i Creative Commons Attribution-NonCommercial-licensen (http://creativecommons.org/licenses/af-nc/4.0/), som tillader ubegrænset ikke-kommerciel brug, distribution og reproduktion i ethvert medie, forudsat at det originale værk er korrekt citeret. De vilkår, hvorunder denne artikel er blevet offentliggjort, tillader offentliggørelse af det accepterede manuskript i et arkiv af forfatteren(e) eller med deres samtykke.

Machine Translated by Google

dramatiske forskelle i mængden og typen af resterende DNA i vaccinerne. Disse oprensningstrin er fremhævet i Modernas patent US10898574B2 og er baseret på en PCR-fri metode, der direkte oprenser plasmid-DNA fra E. coli dyrket i en kanamycinbouillon. Modernas patent angiver, at et genetisk modificeret DNA (f.eks. nøgent plasmid-DNA) pakket i en lipid-nanopartikel (LNP) injiceres direkte i en levende vært og kan forårsage insertionsmutagenese og aktivering af onkogener eller hæmning af tumorsuppressorgener [1].

Efter den amerikanske fødevare- og lægemiddelstyrelses (FDA) godkendelse og udrulning af COVID-19-vaccinen ændrede Pfizer sin fremstillingsproces fra PCR-amplifikation af en DNA-skabelon (proces 1) til det randomiserede kliniske forsøg (RCT) til en PCR-fri oprensningsproces ved hjælp af DNA-plasmider (proces 2) ligesom den, der anvendes af Moderna [2]. BioNTech-patentet US20230183769A1 tilvejebringer en metode til storskalaproduktion af RNA af farmaceutisk kvalitet ved hjælp af in vitro-transkriptionsreaktioner og reducerer samtidig den procesrelaterede forurenende dsRNA [3]. Da proces 2 anvendte et 7,8 Kb bakterieplasmid i stedet for det 4,2 Kb PCR-amplikon, der blev anvendt i proces 1 til in vitro-transkriptionen, er det dog sandsynligt, at der var en stor stigning i det resterende DNA i det endelige lægemiddelprodukt [1].

På grund af de forskellige DNA-rygrad mellem Proces 1 og Proces 2 er det enkelte qPCR-assay, der anvendes af Pfizer til at detektere en specifik del af DNA'et, muligvis ikke tilstrækkeligt til nøjagtig kvantificering. De PCR-baserede metoder, der anvendes i Pfizers kliniske forsøg, indeholder meget forskelligt baggrunds-DNA sammenlignet med de vacciner, der gives til offentligheden, da PCR-processen kun amplificerede den del af plasmidet, der koder for spike-mRNA-sekvensen. E. coli-oprensningsmetoden i Proces 2 indeholder plasmidvektorsekvensen med det klonede spike-sekvensindsæt. Derfor kræves der resterende DNA-kvantificeringsmetoder, der vurderer både plasmidet og indsættet, i modsætning til Pfizers proces, der kun udførte PCR på KAN-genet (dvs. kanamycinresistensgenet) fra plasmidvektoren, for fuldstændig kvantificering. Pfizer oplyste tilsynsmyndighederne om et qPCR-assay for spike-regionen for at bekræfte tilstedeværelsen af spike-indsættet, men leverede ingen kvantificering fra dette validerede andet assay. Dette er relevant, da DNase I vides ikke at være i stand til at fordøje RNA:DNA-hybrider. Disse hybrider vil eksistere i spike-sekvensen efter in vitro-transkription (IVT) og kan også eksistere i form af rest-RNA fra plasmidekspressionen af AmpR-SV40-KAN-genet, når det formeres i E. coli. DNase I-aktiviteten kan således variere på forskellige steder i plasmidet. Assays, der kun måler én placering af plasmidet, vil ikke være i stand til nøjagtigt at kvantificere det resterende DNA i det endelige lægemiddelprodukt [4].

Pfizer- og Moderna-plasmiderne deler mange træk, men de adskiller sig mest markant ved, at Pfizers plasmid er et derivat af pcDNA3.1, som er en shuttle-vektor, der er i stand til både bakteriel og pattedyrs replikation via SV40-replikationsorigins, SV40-enhancers, SV40-promotorer og SV40 polyA-signaler [5]. Plasmid-DNA-skabelonen, der anvendes af Pfizer (7.824 bp) og Moderna (6.777 bp), indeholder begge et ColE1-bakterielt replikationsorigins (generisk betegnet ori), der er aktivt i E. coli. Begge plasmider indeholder også et aminoglykosidphosphotransferasegen (Neo/Kan), der muliggør selektion af bakterier, der bærer plasmidet, i medier, der indeholder kanamycin. E. coli-cellerne høstes derefter og lyseres. Plasmid-DNA'et ekstraheres, oprenses og lineariseres derefter med restriktionsenzymet Eam1104I. Dette lineære DNA fungerer derefter som skabelon for IVT ved hjælp af T7 RNA-polymerase i nærvær af N1-methyl-pseudouridin. Det er tilsætningen af N1-methyl-pseudouridin, der gør disse produkter til biomanipulerede nukleosidmodificerede mRNA (dvs. modRNA)-vacciner. Efter IVT hydrolyseres DNA enzymatisk med DNase I, hvilket reducerer dets prævalens i det endelige lægemiddelprodukt. Dokumenter leveret af Pfizer til Det Europæiske Lægemiddelagentur (EMA) [6] bemærkede, at resterende DNA i modRNA-produkter fremstillet ved denne proces kunne variere betydeligt [7].

I 2023 undersøgte McKernan et al. COVID-19 modRNA-vaccinehætteglas for næstegenerations RNA-sekventering og fandt uventede tegn på DNA afledt af de skabelonplasmider, der blev brugt under fremstillingen [8]. Dette viste, at både Pfizer- og Moderna-vacciner indeholdt plasmidkomponenter med høj kopieringsgrad og forskellige resterende DNA-sekvenser. Derudover fandt McKernan et al., at alle Pfizer-vacciner indeholdt SV40-promotor-enhancer-ori- og SV40-polyA-signalsekvenser, der blev anvendt som promotor for den Kan/Neo-selekterbare markør. Disse resterende DNA-komponenter var fraværende i de krævede oplysninger i EMA's regulatoriske dokumenter (s. 24 Rapporteur Rolling Review 3) [7].

Baseret på denne information udviklede McKernan et al. en qPCR-metode til at kvantificere niveauet af resterende plasmid-DNA i vaccinehætteglas, der er målrettet mod flere loci i Moderna- og Pfizer-plasmiderne [8]. Formålet med denne forskning var derfor at verificere tilstedeværelsen og mængden af resterende plasmid.

Machine Translated by Google

DNA og SV40-promotor-enhancer-ori i Pfizer og Moderna COVID-19 modRNA-vaccinen og sammenligner resultaterne med bivirkninger (AEs) rapporteret til Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). For at undersøge dette indhentede vi 32 hætteglas med COVID-19 modRNA-vacciner, der var blevet distribueret i Ontario, Canada. Mængden af specifikke DNA-mål, dvs. spike, plasmid ori og SV40-promotor-enhancer-ori, blev bestemt ved qPCR, og de samlede DNA-mængder blev bestemt ved Qubit®-fluorometri. Vi udvidede også observationerne fra et tidligere arbejde (McKernan et al.) ved at studere størrelsesfordelingen af DNA-fragmenter samt vaccinens DNase I-følsomhed for at bestemme, om det resterende DNA er pakket i LNP'erne. Vi undersøgte derefter VAERS for eventuelle AEs, inklusive alvorlige AEs (SAEs), forbundet med disse partier [9]. Denne undersøgelse er en udvidet version af en tidligere preprint [10].

Materialer og metoder

I denne undersøgelse brugte vi udtrykkene "resterende DNA", "DNA-masse" eller "urenheder" (eller lignende) i stedet for "kontaminering" i overensstemmelse med lovgivningsmæssige definitioner af urenheder, der stammer fra fremstillingsprocessen [11,12]. Baseret på FDA's og US Pharmacopeia (USP) retningslinjer er "urenheder" uønskede stoffer, der er forbundet med fremstillingsprocessen eller de råmaterialer, der anvendes i vaccineproduktion. Urenheder er typisk forventede, forudsigelige og stammer fra de materialer, reagenser eller mellemprodukter, der anvendes under produktionen. Urenheder omfatter dsRNA, RNA:DNA-hybrider, korte RNA-fragmenter og de resterende plasmid-DNA-fragmenter. Hvorimod "kontaminering" refererer til utilsigtede, fremmede stoffer, der introduceres i vaccineproduktet gennem eksterne kilder, såsom miljøfaktorer, udstyr eller menneskelige fejl, som ikke er en del af den tilsigtede fremstillingsproces. Kontaminering er typisk uventet og kan omfatte mikrobielle forurenende stoffer (f.eks. bakterier, svampe), utilsigtede agenser (f.eks. virus) eller fremmede partikler.

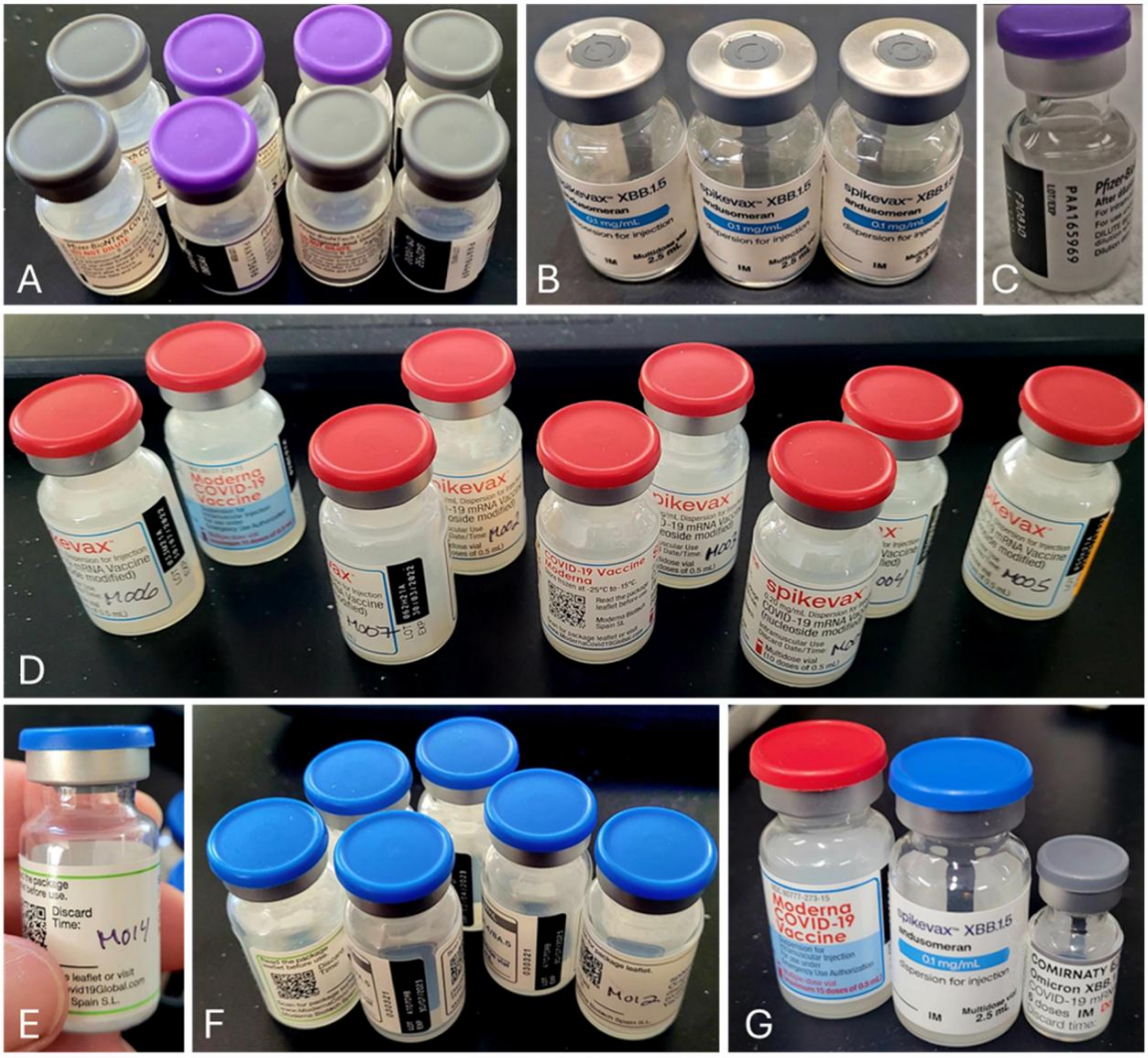
COVID-19-vaccinebatcher

Hætteglas med Pfizer-BioNTech BNT162b2 (10 hætteglas; 6 partier) og Moderna Spikevax mRNA-1273 (22 hætteglas, 10 partier) blev indkøbt fra forskellige apoteker i Ontario, Canada (figur 1 og tabel 1). Et uåbnet sterilt injicerbart hætteglas med alprostadil 66 mcg/ml i kombination med papaverin 21,7 mg/ml og phentolamin 1 mg/ml (TriMix) blev brugt som negativ kontrol. De uåbnede hætteglas var uændrede, da de havde intakte flip-off plastiklåg med trykte partinumre og udløbsdatoer. Hætteglassene var blevet opbevaret på apoteker i specialbyggede vaccineopbevaringsenheder ved +2-8 °C og blev transporteret i isolerede beholdere med frosne gelpakker, inden de blev placeret i testlaboratoriets køleskab inden for 5 timer efter modtagelsen. Et Moderna-hætteglas manglede en trykt udløbsdato, men havde en QR-kode, der krævede scanning af en farmaceut. Moderna XBB.1.5-hætteglassene blev opbevaret på lignende vis af apoteket. Rester af nyligt brugte hætteglas (inden for 30 minutter efter administration) blev anbragt i en isoleret beholder med frosne gelpakker og transporteret til testlaboratoriets køleskab inden for 12 timer.

qPCR-analyse af spike, ori og SV40 promoter-enhancer-ori DNA

qPCR-analyser målrettede spike- og plasmid-ori-sekvenser, der deles af Moderna- og Pfizer-ekspressionsplasmiderne (Tabel 2). Disse primere blev også brugt til at teste COVID-19 modRNA-vaccinehætteglas i Australien [15]. Uniplex SV40 Enhancer-analysen blev designet til at amplificere den nukleare målretningssekvens, der er unik for Pfizer-plasmidet [16]. Alle qPCR-analyser anvendte 1 µL fra hvert hætteglas direkte tilsat til 17,8 µL mastermix. qPCR-kittene blev indkøbt fra Medicinal Genomics (delnr. 420201, Beverly, USA), hvor mastermixen indeholdt 8,8 µL reaktion bestående af 3,8 µL polymeraseenzym (Medicinal Genomics delnr. 420201), 0,8 µL reaktionsbuffer og 1,0 µL Primer-Probe-blanding samt 12,2 µL ddH20. En primer-probe-blanding blev samlet ved hjælp af 12,5 µL 100 µM ori-probe, 12,5 µL 100 µM spike-probe, 25 µL 100 µM spike forward primer, 25 µL 100 µM spike reverse primer, 25 µL 100 µM ori forward primer, 25 µL 100 µM ori reverse primer og 75 µL ddH20. Alle

Machine Translated by Google



Figur 1. Hætteglas med Pfizer/BioNTech BNT162b2 og Moderna Spikevax mRNA-1273 COVID-19-vaccine fra Ontario, Canada: (A) Pfizer/BioNTech monovalent og bivalent til voksne; (B) Moderna monovalent til voksne XBB.1.5; (C) Pfizer-BioNTech monovalent til voksne; (D) Moderna monovalent til børn/voksne; (E) bivalent Wuhan-BA.1 til børn/voksne; (F) bivalent Wuhan-BA.1 til børn/voksne og bivalent Wuhan-BA.4/5 til voksne; og (G) blanding af Moderna monovalent til børn/voksne og monovalent til voksne XBB.1.5 samt Pfizer-BioNTech monovalent til voksne XBB.1.5. Ét hætteglas med Moderna monovalent til børn/voksne blev ikke fotograferet.

qPCR-analyser anvendte en syntetisk gDNA-kontrol (gBlock, Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego, USA) med kendt koncentration (1 ng/µL) til at generere en kalibreringskurve afledt af 10 gange seriel fortynding.

Cyklisering blev udført på en QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) med en initial denaturering på 95 °C i 3 minutter efterfulgt af 35 cyklusser på 95 °C i 10 sekunder og 65 °C i 30 sekunder. Cq-konvertering til ng/µL blev beregnet ved hjælp af QuantStudio-softwaren v2.7.0 (ThermoFisher Scientific).
Amplikonmasse, bestemt med New England BioLabs DNA-beregneren [17] og længde (105 bp for ori, 114 bp for spike og 152 bp for SV40-promotor-enhancer-ori), blev brugt til at estimere det samlede antal nanogram (ng) tilstedeværende DNA ved at justere for plasmidernes længde (7.824 bp for Pfizer og 6.777 bp for Moderna). Kopitallet pr. dosis blev først justeret for fortyndingerne (f.eks. 1:5 fortynding for Pfizer Adult Monovalent) og derefter for volumenet af hver injektionsdosis til voksne (300 µL for Pfizer og 500 µL for Moderna). Serielle fortyndinger blev udført på de tre Pfizer-partier, der viste den højeste resterende DNA-koncentration, for at undersøge PCR-hæmning af LNP'erne, da qPCR blev udført direkte uden nogen behandling eller ekstraktion.

Machine Translated by Google

Tabel 1. Beskrivelse af mRNA COVID-19-vaccinepartier undersøgt i dette studie.

Information om vaccineproduktion							VAERS-data	
Fabrikant	Mono-/bivalent	Parti nr.	Forseglet	HC-godkendelsesdato	Udløbsdato	Udløbet samlet AES		Total SAES
Pfizer-BioNTech Voksen	Monovalent	FD0810	Forseglet	Pfizer-BioNTech Voksen	2021-07-29	2022-05-31	Udløbet	941	154
Monovalent Forseglet FM7380 Pfizer-BioNTech Voksen Monovalent FN7934a Forseglet					2022-01-05	2022-11-30	Udløbet	64	25
Pfizer-BioNTech Voksen Monovalent FN7934b Forseglet					2022-01-11	2022-10-31	Udløbet	50	25
Pfizer-BioNTech Voksen Monovalent Forseglet FX4343a Pfizer-BioNTech Voksen					2022-04-13	2023-07-31	Udløbet	4	1
FX4343b Forseglet									
Pfizer-BioNTech Voksen Bivalent GK0932a Forseglet Pfizer-BioNTech Voksen Bivalent					2022-10-19	2024-02-29	I kode	20	2
GK0932b Forseglet									
Pfizer-BioNTech Voksen Bivalent GK0932c Forseglet									
Pfizer-BioNTech Voksen Monovalent XBB.1.5 HD9867 Forseglet Moderna Barn/Voksen					2023-09-28	2024-10-31	I kode	14	5
Monovalent 092D21A Forseglet Moderna Barn/Voksen Monovalent 020E21Aa Forseglet					2021-06-13	2022-02-13	Udløbet	49	41
Moderna Barn/Voksen Monovalent 020E21Ab Forseglet					2021-07-08	2022-03-04	Udløbet	6	2
Moderna Barn/Voksen Monovalent 062H21Aa Forseglet Moderna Barn/Voksen					2021-10-27	2022-05-31	Udløbet	10	3
Monovalent 062H21Ab Forseglet									
Moderna Barn/Voksen Monovalent Forseglet 020J21A Moderna Barn/Voksen					2021-11-18	2022-06-30	Udløbet	7	5
055K21A Forseglet Moderna Barn/Voksen Monovalent 033M21Aa Forseglet Moderna					2021-12-16	2022-07-31	Udløbet	2	2
Barn/Voksen Monovalent 033M21Ab Forseglet					2022-02-11	2022-09-30	Udløbet	2	1
Moderna Barn/Voksen Monovalent 033M21Ac Forseglet									
Moderna Barn/Voksen Monovalent 033M21Annonce Forseglet									
Moderna Barn/Voksen Bivalent BA.1 AS0467Da Forseglet Moderna Barn/Voksen Bivalent					2022-09-23	2023-04-02	Udløbet	0	0
BA.1 AS0467Db Forseglet									
Moderna Barn/Voksen Bivalent BA.1 AS0467Dc Forseglet									
Moderna Voksen Bivalent BA4/5 AT0709Ba Forseglet Moderna Voksen Bivalent BA4/5					2022-11-28	2023-10-30	Udløbet	0	0
AT0709Bb Forseglet									
Moderna Voksen Bivalent BA4/5 AT0709Bc Forseglet									
Moderna Voksen Bivalent BA4/5 AT0709Bd Forseglet									
Moderna Voksen Monovalent XBB.1.5 020G23Aa Uforseglet 2023-09-15 Moderna Voksen Monovalent XBB.1.5						2024-07-29	I kode	0	0
020G23Ab Uforseglet									
Moderna Voksen Monovalent XBB.1.5 020G23Ac Uforseglet									
Moderna Voksen Monovalent XBB.1.5 025G23A Uforseglet 2023-09-15						2024-08-10	I kode	0	0

Sorteret efter Canadas sundhedsmyndigheders godkendelsesdato for lot som registreret i det canadiske nationale vaccinekatalog [13]. Bivirkninger (AEs) og alvorlige AEs og SAEs stammer fra Canada) blev udtrukket fra VAERS-databasen, der er tilgængelig til offentlig download (https://vaers.hhs.gov). [14]. Små bogstaver i slutningen af lotnumre angiver forskellige hætteglas af samme lot.

Tabel 2. Primer- og probesekvenser rettet mod spike, ori og SV40-promotor-enhancer-ori.

Primer-/probenavn	Sekvens (5'-3')a	Amplikonlængde
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Forward	AGATGGCCTACCGGTTCA	114 bp
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Reverse	TCAGGCTGTCCTGGATCTT	
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Probe MedGen_Vax-	5'6-FAM-CGAGAACCA-ZEN-GAAGCTGATCGCCAA-3'IABkFQb	
Vector_Ori_Forward MedGen_Vax-	CTACATACCTCGCTCTGCTAATC	105 bp
Vector_Ori_Reverse MedGen_Vax-	GCGCCTTATCCGGTAACTATC	
Vector_Ori_Probe MedGen_SV40-	5HEX-AAGACACGA-ZEN-CTTATCGCCACTGGC-3'IABkFQc	
promoter-enhancer-ori_Forward MedGen_SV40-promoter-	GTCAGTTAGGGGTGTGGAAAGT	152 bp
enhancer-ori_Reverse MedGen_SV40-promoter-enhancer-	GGTTGCTGACTAATTGAGATGC	
ori_Probe Der blev anvendt en bivalent Pfizer-	5TEX615-CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGC-3'IAbRQSpd	

ekspressionsvektor BNT162b2 (OR134577.1) og Modern mRNA1273-ekspressionsvektor (OR134578.1) sekvens.
til primerdesign.
bProbe havde en 5'-terminal mærket med en 6-FAM (6-carboxy-fluorescein) fluorofor, en ZEN™ intern quencher og en 3'-terminal mærket med 3' Iowa Black® FQ.
c Proben havde en 5'-terminal mærket med en 5HEX (hexachlorofluorescein) fluorofor, en ZEN™ intern quencher og en 3'-terminal mærket med 3' Iowa Black® FQ.
dProben havde en 5'-terminal mærket med en TEX 615 fluorofor og en 3'-terminal mærket med 3' Iowa Black® RQ.

Qubit® fluorometrisk kvantificering

AccuGreen® HS fluorometriske reagenser (AccuGreen #99820 og DNA-kvantificeringsbuffer #99979) og standarder blev erhvervet fra Biotium (San Francisco, USA) til Qubit®-analyse (ThermoFisher Scientific). Fluorometriske aflæsninger blev initialt udført direkte på vaccinerne i en 200 µL blanding indeholdende fluorometriske reagenser (190 µL af en stamopløsning lavet af 995 µL HS-buffer og 5 µL 200X AccuGreen®-farvestof) og 10 µL vaccine. Prøverne blev aflæst i henhold til producentens instruktioner på et Qubit® 3.0 fluorometer. Disse prøver blev derefter opvarmet til 95 °C i 8 minutter og afkølet til 4 °C i 5 minutter for at forstyrre LNP'erne og give fluorometriske farvestoffer adgang til DNA'et. For at vurdere p

Machine Translated by Google

For at opnå et signal afledt af AccuGreen®-binding til modificeret RNA, blev 1 µL 20 mg/ml RNase A (NEB# T3018L) tilsat prøverne efter opvarmnings-/afkølingstrinnet, og prøverne blev inkuberet ved 37 °C. I løbet af dette tidsrum blev en tidsserie af fluorescensmålinger indsamlet. Fluorometrimålinger blev indsamlet før tilsætning af RNase A og 1, 2, 3, 5 og 10 minutter efter tilsætning af RNase A.

Data fra vaccinebivirkningsrapporteringssystemet (VAERS)

VAERS-databasen blev analyseret ved hjælp af Language and Environment for Statistical Computing-pakken i R [18] og omfattede data fra perioden 17. december 2020 til 6. oktober 2023. De amerikanske VAERS-data kan downloades i tre separate kommaseparerede værdier (csv), der repræsenterer: i) generelle data for hver rapport; ii) de rapporterede bivirkninger eller "symptomer" og iii) vaccinedata inklusive vaccineproducent og lotnummer [9]. Et ikke-amerikansk (udenlandsk) VAERS-datasæt kan også downloades og indeholder bivirkninger, der er indsendt til regulerende myndigheder fra ikke-amerikanske lande verden over. Et VAERS ID-nummer tildeles for at bevare fortroligheden, når en rapport indgives. For at vurdere de bivirkninger, der er relateret til en bestemt vaccine, er det nødvendigt at flette de tre datafiler sammen ved hjælp af VAERS ID'erne som en linkende variabel. I denne undersøgelse blev kun COVID-19 VAX_TYPE (COVID19-1 (monovalent) og COVID19-2 (bivalent)) inkluderet. Andre relevante variabler omfattede VAERS ID*, vaccinelot (VAX_LOT), vaccineproducent (VAX_MANU), hospitalsindlæggelser (HOSPITAL), handicap (DISABLE), besøg på skadestuen (ER_ED_VISIT), fødselsdefekter (BIRTH_DEFECT), livstruende hændelser (L_THREAT) og dødsfald (DIED). Data blev grupperet efter VAX_LOT, og det samlede antal AE- og SAE-rapporter blev talt. SAE-rapporter omfattede dødsfald, hospitalsindlæggelser, besøg på skadestuen, handicaprapporter, fødselsdefekter og livstruende rapporter. Der blev forespørget på data fra og uden for USA, og i forbindelse med denne undersøgelse er kun antallet af canadiske lotter rapporteret i de primære resultater. Canadiske rapporter blev skelnet fra ikke-amerikanske (udenlandske) rapporter ved hjælp af SPLTTYPE-variablen, som angiver landekoden - i tilfælde af Canada "CA" - som de første 2-tegns pladsholdere. Korrelationer mellem VAERS-data og DNA-niveauer for spike, ori og SV40 blev plottet og beregnet ved hjælp af Pearson-korrelationskoefficienten.

Oxford nanoporesekventering

DNA-fragmentstørrelsesfordelinger blev estimeret ved hjælp af et tidligere sekventeret vaccineparti (Pfizer børne-monovalent lot# FL8095) [8] som standard ved hjælp af en Oxford Nanopore Flongle (R.10.4.1, Oxford Nanopore Technologies (ONT), New York, USA) og Oxford Nanopore Ligation sequencing kit (SQK-LSK114) i henhold til producentens instruktioner. Aflæsningerne blev kortlagt til NCBI OR134577.1 med Burrow-Wheeler Aligner med maksimale eksakte matches (BWA-MEM) [19]. ONT-sekventeringslæselængden er ubegrænset, men DNA-isoleringsprocedurer, der kræves for at køre ONT-sekventering, kan påvirke længden af de molekyler, der er fanget i ONT-ligeringsreaktionen. Kortere fragmenter kan gå tabt med den SPRI-baserede DNA-indfangning, der anvendes i disse metoder. Enkeltmolekyleaflæsninger blev talt og sorteret i henhold til deres kortlagte læselængde med BWA-MEM.

Vurdering af nukleasefølsomhed

Pfizer Lot# FL8095 blev også brugt som standard til at vurdere DNase I-følsomheden af vaccinemateriale.
Pakket DNA i LNP bør være utilgængeligt og dermed resistent over for DNase I, mens DNA uden for LNP bør være DNase I-labilt.

Nukleasebeskyttet DNA blev estimeret ved at behandle 20 µL af vaccinen med 2,5 µL DNase I-XT (2 enheder/µL, NEB#M0570S, New England BioLabs Inc, Ipswich, USA) i Grim Reefer 10X buffer (Medicinal Genomics #420123-125) og inkubere ved 37°C i 30 minutter. Til kontrollen blev 2,5 µL ddH20 anvendt i stedet for DNase I-XT. DNase I-XT-reaktionen blev afsluttet ved hjælp af 2,5 µL MGC-lysebuffer (Medicinal Genomics #420001). Efter DNase I-dræbningstrinnet blev et qPCR-amplificerbart internt kontrol-DNA tilsat for at verificere, at DNase I-XT var blevet fuldstændigt inaktiveret (Medicinal Genomics #420123-125). Efterfølgende blev 54 µL SenSATIVAx magnetiske perler (Medicinal Genomics) anvendt til at

Machine Translated by Google

Oprens DNA fra DNase I-XT-assayet og de negative DNase I-XT-kontrolprøver. De magnetiske perler blev pipetteblandet 10 gange med prøven, inkuberet ved stuetemperatur i 5 minutter, separeret magnetisk og vasket to gange med 70% v/v ethanol. Ethanolen blev fjernet, og perlerne blev tørret i 2 minutter ved stuetemperatur. Prøverne blev elueret i 30 µL ddH20 , og 1 µL eluat blev undersøgt ved qPCR for spike og ori i en 18,8 µL reaktion. En yderligere DNase I-inaktiveringskontrolprimer og probe (0,5 µL CY5-mærket probe) blev tilsat assayet, hvilket gav en i alt 19,3 µL reaktion.

Resultater

qPCR-testning af rest-DNA

Vi validerede nøjagtigheden af qPCR-kvantificeringsmetoden ved hjælp af en 8-log seriel fortyndingsstandardkurve, der blev brugt til at kalibrere prøvens Cq-værdier, og genererede R2- værdier på 0,998, 0,999, 0,906 og effektiviteter på henholdsvis 99,8 %, 94,7 % og 93,6 % for spike-, ori- og SV40-promotor-enhancer-ori-amplikoner. På alle plader blev negative kontroller og kontroller uden skabelon (ddH20) (NTC) testet i triplikat og fundet negative.

Indledende test udført på ufortyndede vaccineprøver viste, at alle Pfizer-hætteglas var positive for spike, ori og SV40 promoter-enhancer-ori. For individuelle hætteglas amplificeredes qPCR for Pfizer på lignende tidspunkter for spike, ori og SV40 enhancer-promoter-ori (gennemsnitlig ÿCq 0,89 ± 0,28). Selvom Pfizer lot FX4343 amplificerede lidt senere end de andre hætteglas, var forskellen mellem hætteglassene lille (spike ÿCq 17,86 ± 1,58; ori ÿCq 17,91 ± 2,05; SV40 promoter-enhancer-ori ÿCq 15,46 ± 2,02). Forskellen mellem hætteglassene for hvert af målene var også lille for Moderna (spike Cq 20,65 ± 0,88; ori Cq 25,48 ± 1,32).

For alle Moderna-hætteglas, undtagen lot AS0467D (bivalent BA.1), amplificerede ori dog konsekvent 2,95 ± 0,30 cyklusser senere end spike-effekten. SV40-promotor-enhancer-ori blev detekteret i alle Pfizer-hætteglas, men i ingen af Moderna-hætteglassene.

For at vurdere LNP-hæmning på qPCR-reaktionseffektiviteten blev hætteglas med lot FM7380 og FN7934 underkastet en 10-fold seriel fortynding. Den forventede kvantificeringscyklus (Cq) på ~3,3 blev først observeret efter 1:10 fortyndingen, hvilket tyder på, at der er en vis LNP-hæmning, som kan påvirke kvantificeringen af DNA ved disse fortyndinger. Derfor blev dataene fra 1:10 fortyndingerne brugt til yderligere analyse. Denne fortynding, såvel som det faktum, at nogle af doserne var designet til at blive fortyndet før brug, blev taget i betragtning i vores beregninger.

Mængden af specifikke resterende DNA-fragmenter bestemt ved qPCR

qPCR-test af hætteglassene fortyndet 1:10 gav Cq-værdier for ori og spike på 18,44-24,87 og 18,03-23,83 for Pfizer, og henholdsvis 25,24-30,10 og 22,35-24,53 for Moderna (Tabel 3). SV40 promoter-enhancer-ori-assayet producerede Cq-værdier på 17,46-24,65 i Pfizer-hætteglassene og amplificerede ikke i Moderna-hætteglassene. Reproducerbarheden af spike-, ori- og SV40-assayene var henholdsvis 0,72 ± 0,14, 0,74 ± 0,23 og 0,65 ± 0,16 for Pfizer, og 0,83 ± 0,14, 0,89 ± 0,18 og negativ for Moderna. Efter beregninger varierede mængden af resterende DNA betydeligt mellem de analyserede Pfizer-partier [0,22-2,43 ng/dosis for spike, 0,28-7,28 ng/dosis for ori og 0,25 til 23,72 ng/dosis for SV40 promotor-enhancer-ori], men var mere konsistent i Moderna-lotterne [0,25-0,78 ng/dosis for spike og 0,01-0,34 ng/dosis]. Mens Pfizer havde en væsentligt højere mængde resterende DNA end Moderna, var det kun SV40 promotor-enhancer-ori-DNA'et fra lotterne FM7380 og FN7934, der lå over FDA's vejledning på 10 ng DNA/dosis (figur 2). Loterne FM7380 og FN7934 var Pfizer monovalente hætteglas med lilla top og en PBS-formulering.

Total DNA bestemt ved fluorometri

Fluorometerbaserede målinger (f.eks. Qubit®) af vaccinerne viste, at Moderna-hætteglassene konsekvent havde en meget større mængde total DNA end Pfizer-hætteglassene (figur 3). Det samlede DNA, der blev detekteret i den ufortyndede vaccine (dvs. direkte fra hætteglassene), var 621 ± 282 ng/dosis (interval: 262 til

Machine Translated by Google

Tabel 3. qPCR-test på alle Pfizer-BioNTech- og Moderna-hætteglas fortyndet 1:10 med resultater for SARS-CoV-2-spike, ori og SV40-promotor-enhancer-ori.

		Plasmid Replikationsorigin (ori)								
		Spike						SV40 promotor-enhancer-ori		
Fabrikant	Parti nr.	Cq	Total ng/dosis	Samlede kopier/ dosis	Cq	Total ng/dosis	Samlede kopier/ dosis	Cq	Total ng/dosis	Samlede kopier/ dosis
Pfizer-BioNTech	FD0810 20,17 FM7380		0,43	3,69E+09	19,90	2,80	2,60E+10	20,76	0,43	2,92Ø+09
Pfizer-BioNTech	18,03 FN7934a 18,47		2,43	2,07E+10	18,57	3,92	3,64E+10	18,18	16.06	1.09Ø+11
Pfizer-BioNTech	FN7934b 18,19 FX4343a		1,79	1,53E+10	18,77	3,43	3,18E+10	17,46	23,72	1,60Ø+11
Pfizer-BioNTech	23,53 FX4343b 23,83		2,18	1,86E+10	18,44	4,27	3,96E+10	17,96	18.10	1.22Ø+11
Pfizer-BioNTech	GK0932a 20,46 GK0932b		0,27	2,30E+09	24,71	0,32	2,94E+09	24,59	0,26	1,73Ø+09
Pfizer-BioNTech	20,60 GK0932c 20,66		0,22	1,86E+09	24,87	0,28	2,64E+09	24,65	0,25	1,68Ø+09
Pfizer-BioNTech	HD9867 21,24 092D21A		2,25	1,92E+10	21,01	3,81	3,54E+10	20,27	2,61	1,77Ø+10
Pfizer-BioNTech	22,35 020E21Aa 23,66		2,05	1,75E+10	21,22	3,32	3,08E+10	20,49	2,35	1,59Ø+10
Pfizer-BioNTech	020E21Ab 24,52		1,97	1,68E+10	21,21	3,33	3,09E+10	20,29	2,58	1,74E+10
Pfizer-BioNTech	062H21Aa 22,52		0,99	8,46E+09	20,81	7,28	6,75E+10	20,12	2,84	1,92E+10
Moderne	062H21Ab 22,76 020J21A		0,66	5,64E+09	27,88	0,04	4,16E+08	Negativ		
Moderne	23,21 055K21A 22,94		0,35	3,02E+09	29,47	0,02	1,87E+08	Negativ		
Moderne	033M21Aa 23,04		0,50	4,24E+09	29,99	0,09	8,26E+08	Negativ		
Moderne	033M21Ab 22,81		0,78	6,69E+09	29,21	0,02	2,23E+08	Negativ		
Moderne	033M21Ac 033M21Ad		0,66	5,64E+09	29,37	0,02	2,00E+08	Negativ		
Moderne	AS0467Da AS0467Db		0,48	4,12E+09	30,10	0,01	1,23E+08	Negativ		
Moderne	AS0467Dc AT0709Ba		0,58	4,98E+09	29,58	0,02	1,74E+08	Negativ		
Moderne	AT0709Bb AT0709Bc		0,54	4,65E+09	29,46	0,02	1,88E+08	Negativ		
Moderne	AT0709Bd		0,64	5,44E+09	29,38	0,02	1,99E+08	Negativ		
Moderne	23,59		0,37	3,18E+09	29,87	0,02	1,43E+08	Negativ		
Moderne	23,26		0,47	3,98E+09	29,39	0,02	1,97E+08	Negativ		
Moderne	23,20		0,49	4,17E+09	25,24	0,34	3,20E+09	Negativ		
Moderne	24,16		0,25	2,14E+09	26,08	0,20	1,82E+09	Negativ		
Moderne	23,75		0,33	2,85E+09	25,74	0,25	2,28E+09	Negativ		
Moderne	23,68		0,35	2,99E+09	29,30	0,02	2,09E+08	Negativ		
Moderne	23,56		0,38	3,24E+09	29,25	0,02	2,16E+08	Negativ		
Moderne	23,63		0,36	3,09E+09	29,34	0,02	2,04E+08	Negativ		
Moderne	23,80		0,32	2,74E+09	29,44	0,02	1.91E+08	Negativ		
Moderne	24,42		0,73	6,26E+09	29,42	0,23	2.13E+09	Negativ		
Moderne	24,46		0,71	6,11E+09	29,87	0,03	2.33E+08	Negativ		
Moderne	24,53		0,68	5,84E+09	29,74	0,03	2.55E+08	Negativ		
Moderne	020G23A23A20A24035G23A		0,54	4,62E+09	29,30	0,13	1.20E+09	Negativ		

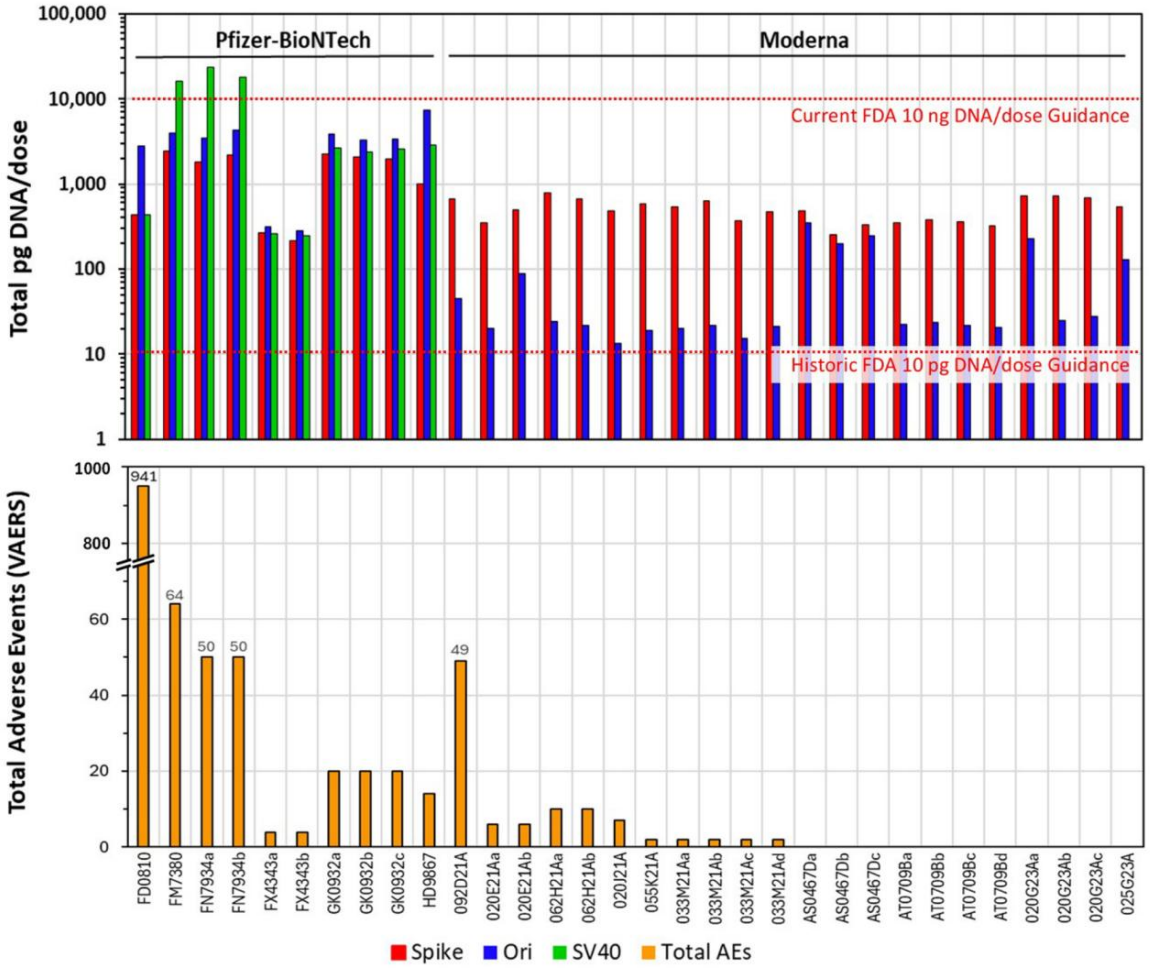
Beregninger for Pfizer og Moderna var baseret på voksendoser på henholdsvis 0,30 ml og 0,50 ml. Moderna er også indiceret til at blive givet til børn i alderen 6-12 år med en dosis på 0,25 ml, hvilket gør den resulterende samlede ng/dosis til halvdelen af den, der gives til voksne. Den samlede ng/dosis blev justeret for amplikonets længde (105 bp ori, 114 bp spike), hvilket kun repræsenterer en brøkdel af Pfizer- og Moderna-plasmidet på 7.824 bp og 6.777 bp. Små bogstaver i slutningen af lotnumrene angiver forskellige hætteglas af samme lot. ÿSV40 promoter-enhancer-ori.

1.116 ng/dosis) for Pfizer og 1.661 ± 793 ng/dosis (interval: 379 til 3.430 ng/dosis) for Moderna. Kogning af den fluorometriske opløsning indeholdende vaccinen forårsagede lysis af lipid-nanopartiklerne, hvilket frigav både resterende DNA og modRNA og øgede mængden af totalt detekteret DNA betydeligt til 1.696 ± 987 ng/dosis (interval: 590 til 3.180 ng/dosis) for Pfizer og 5.210 ± 2.095 ng/dosis (interval: 2.980 til 9.700 ng/dosis) for Moderna. Denne stigning i fluorometri skyldtes også krydstale mellem modRNA og de fluorometriske farvestoffer [21]. Tilsætningen af RNase A nedbrød hurtigt modRNA og reducerede fluorometrien, som stabiliserede sig efter 1 minut. Efter 10 minutter med RNase A var det samlede DNA, der blev detekteret i vaccinehætteglassene, 775 ± 448 ng/dosis (interval: 371 til 1.548 ng/dosis) for Pfizer og 2.821 ± 1.244 ng/dosis (interval: 1.130 til 6.280 ng/dosis) for Moderna. Denne høje mængde total DNA i begge vacciner tyder på, at en høj andel af DNA'et er under qPCR-amplikonernes størrelsesinterval (dvs. er stærkt nedbrudt), og at det anvendte Moderna havde en væsentligt højere mængde plasmid-DNA.

På grund af metodeudvikling og anskaffelse af vaccinerne på forskellige tidspunkter blev vaccinerne testet flere gange ved hjælp af fluorometri (Figur 4). Den gennemsnitlige varians direkte fra hætteglasset (før kogning) var 317 ± 278 ng/dosis (interval: 43-727 ng/dosis) og 456 ± 121 ng/dosis (interval: 199-675 ng/dosis), efter kogning var den 1.145 ± 533 ng/dosis (interval: 519-1.949 ng/dosis) og 1.554 ± 1.023 ng/dosis (interval: 176-3.169 ng/dosis), og efter RNase A-behandling var 297 ± 217 ng/dosis (interval: 100-765 ng/dosis) og 1.065 ± 624 ng/dosis (interval: 113-2.365 ng/dosis) for henholdsvis Pfizer og Moderna.

Vi plottede rest-DNA-værdier opnået ved Qubit-fluorometri mod dem opnået ved qPCR (Figur 5). For Pfizer-produktet havde trendlinjerne for ori- og spike-estimater begge en positiv hældning. Grafen for Moderna-produktet adskiller sig fra Pfizer-produktets med lille overlap.

Machine Translated by Google



Figur 2. Sammenligning af rest-DNA-indhold i spike (rød) ori (blå), SV40 promoter-enhancer-ori (grøn) målt ved qPCR, og det samlede antal bivirkninger (orange) rapporteret til VAERS. Den historiske (10 pg/dosis) og nuværende (10 ng/dosis) FDA- og WHO-reguleringsretningslinje [12,20] for rest-DNA er vist med en rød stiplet linje. Hætteglassene er sorteret efter Health Canadas lotgodkendelsesdato som registreret i det canadiske nationale vaccinekatalog [13]. Små bogstaver i slutningen af lotnumrene angiver forskellige hætteglas af samme lot. Det samlede antal bivirkninger blev bestemt pr. lot og gengivet for hvert hætteglas i samme lot.

af værdier i begge akser, med meget lavere hældninger. Selvom en detaljeret visning af Moderna-plottene antyder en negativ hældning for ori-værdierne, kan denne trendlinje være påvirket af tre yderliggende værdier. Disse værdier blev opnået fra hætteglas med de bivalente Moderna BA.1-Wuhan-vacciner.

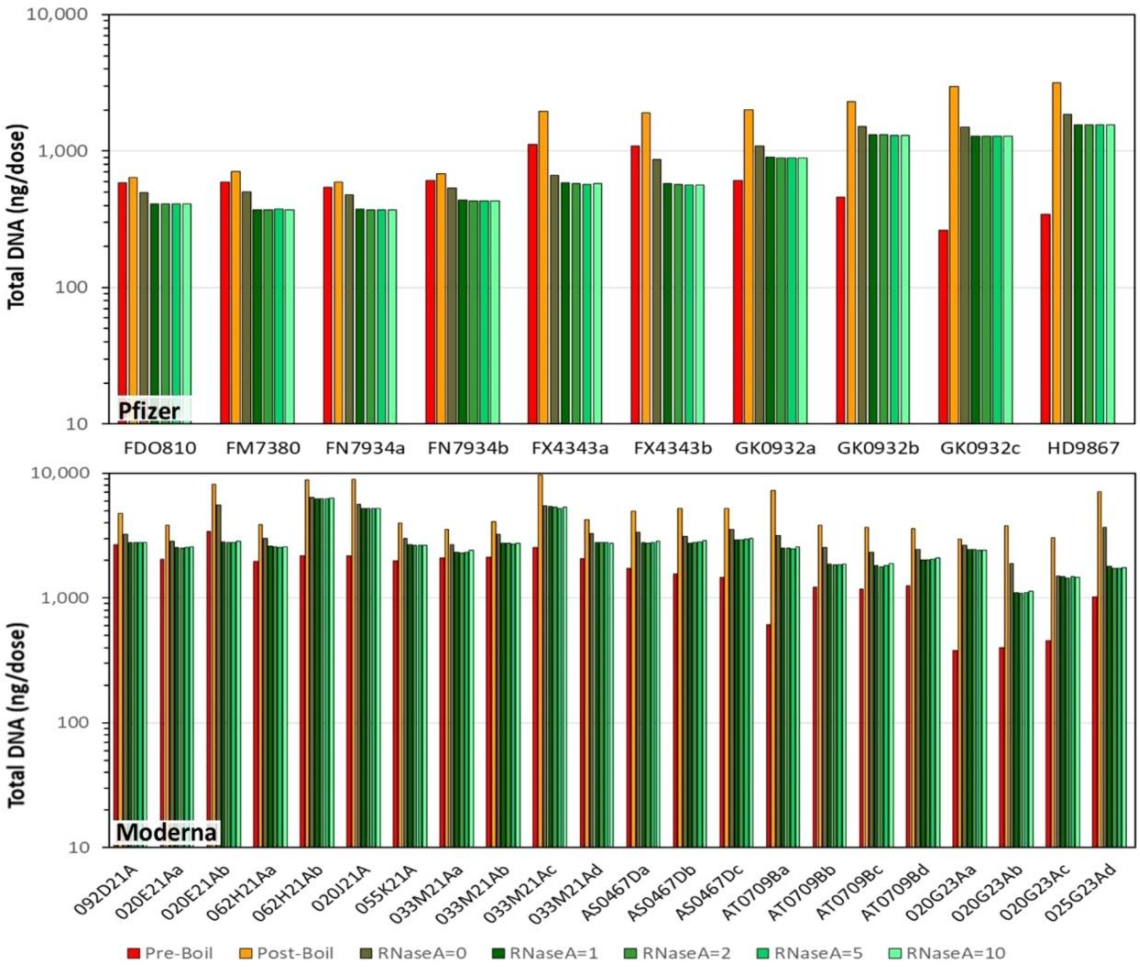
Bortset fra Moderna-partierne AS0709D, AS0467D og 020G23A blev der indsendt VAERS-rapporter for alle partier, der blev undersøgt i dette studie (tabel 2 og figur 2). Ud af de 16 undersøgte partier var partierne med det højeste antal rapporter indsendt til VAERS på verdensplan FD0810, FM7380, FN7934 og 092D21A med henholdsvis 944, 64, 50 og 49 rapporter. I tilfælde af disse partier rapporterede 157 (17%), 25 (39%), 25 (50%) og 42 (86%) af individerne en SAE. Disse procenter overstiger langt den øvre grænse for den forventede procentdel af SAE'er i et givet VAERS-datasæt i henhold til VAERS-dataanvendelsesvejledningen [22].

Det er også værd at bemærke, at 1/6 (17%) rapporter om alvorlige bivirkninger involverede dødsfald for Moderna lot 020E21A.

Med hensyn til canadiske VAERS-rapporter sås den samme tendens, hvor FD0810, FM7380, FN7934 og 092D21A havde henholdsvis 134, 27, 48 og 40 rapporter. I tilfælde af disse partier rapporterede 77 (57%), 16 (59%), 23 (48%) og 38 (95%) af individerne en SAE. Disse procenter overstiger langt den øvre grænse for den forventede procentdel af SAE'er i et givet VAERS-datasæt i henhold til VAERS-dataanvendelsesvejledningen [22]. I tilfælde af Moderna, parti 092D21A, var næsten alle rapporter SAE'er. Procentdelen af SAE'er for alle partier tilsammen med oprindelse i Canada er meget høj på 58%.

Lot FD0180 er det eneste lot i dette studie, der primært blev distribueret og administreret i USA. Af de samlede rapporter for lot FD0810 (n = 944) blev 682 (72%) rapporteret i forskellige stater.

Machine Translated by Google



Figur 3. Total DNA blev målt ved hjælp af Qubit® fluorometri direkte fra hætteglasset (før kogning), efter et 95 °C kogetrin (efter kogning) og på 5 forskellige tidspunkter med RNase A-fordøjelse.

i USA, og mere specifikt blev 546 (58%) rapporteret alene i Colorado (Supplerende tabel 3). Af de ikke-USA-baserede (udenlandske) partier, der blev rapporteret til VAERS for dette parti, blev 83% rapporteret i Canada. 84% af alle udenlandske rapporter (ikke-USA-baserede) blev rapporteret i Canada, hvilket indikerer, at disse hætteglas primært blev distribueret og administreret i Canada.

Analyse af fragmentlængde

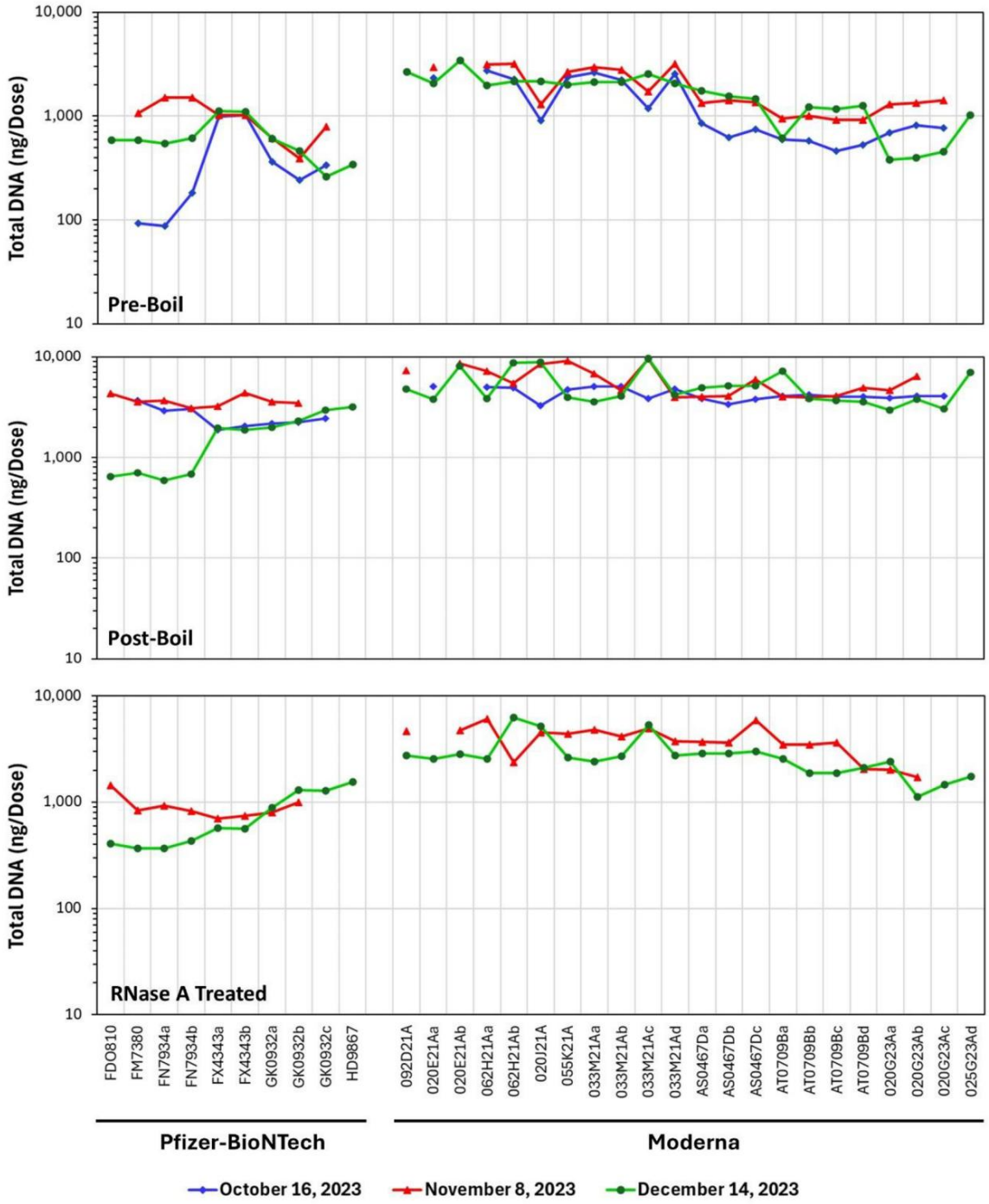
Pfizer børne-monovalenten (Lot FL8095) beskrevet af McKernan et al. [8] blev sekventeret med Oxford Nanopore (ONT) for at vurdere læselængdefordelingerne efter kortlægning af læsene til plasmidets referencesekvens i NCBI (Figur 6). Den længste aflæsning, der blev detekteret i 865 aflæsninger, var 3,5 kb med læsekortlægning til det meste af plasmid-rygraden (Figur 7).

Nukleaseføльsomheden af Pfizer-vaccinen blev vurderet ved hjælp af DNase I-XT. Denne DNA-nuklease er optimeret til IVT-reaktioner rige på RNA-DNA-hybrider. Denne behandling viste ÿ1 Cq offset, mens en nøgen DNA-kontrol tilsat LNP'er blev reduceret fra en Cq på 15 til ikke-detekterbar under de samme betingelser. Dette indikerer, at DNA'et i vaccinerne er beskyttet af indkapsling i LNP'erne (figur 8 og 9).

Diskussion

Der blev detekteret resterende DNA i alle 32 undersøgte vaccinehætteglas. Flere hætteglas fra de samme partier producerede meget ensartede mængder for alle mål, hvilket viser assaypålidelighed, reproducerbarhed og konsistens inden for

Machine Translated by Google

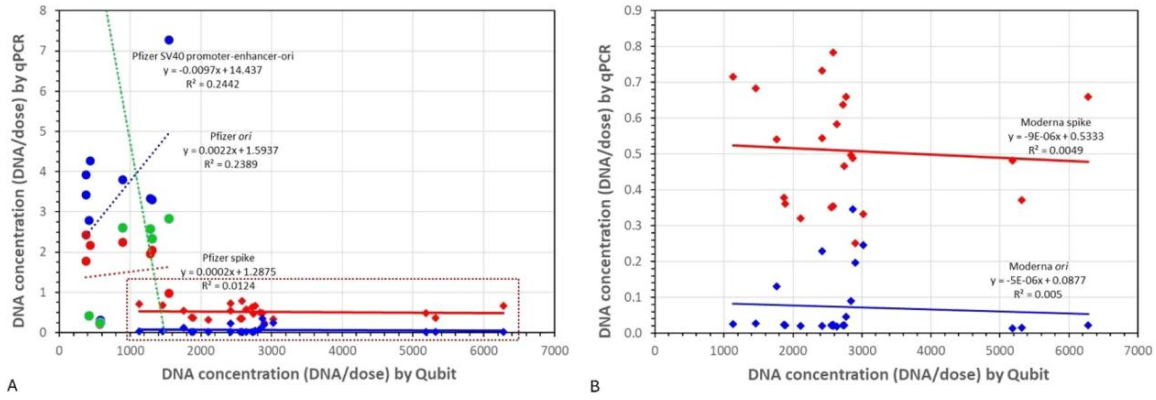


Figur 4. Qubit-målinger blev gentaget efter en fryse-optøningscyklus for at forstå den variation, man kan observere ved forsendelse af frosne hætteglas fra laboratorium til laboratorium. Qubit®-målinger blev taget på tre forskellige tidspunkter (oktober, november og december 2023) direkte fra hætteglasset (før kogning), efter et 95 °C kogetrin (efter kogning) og på tre tidspunkter efter RNase A-fordøjelse.

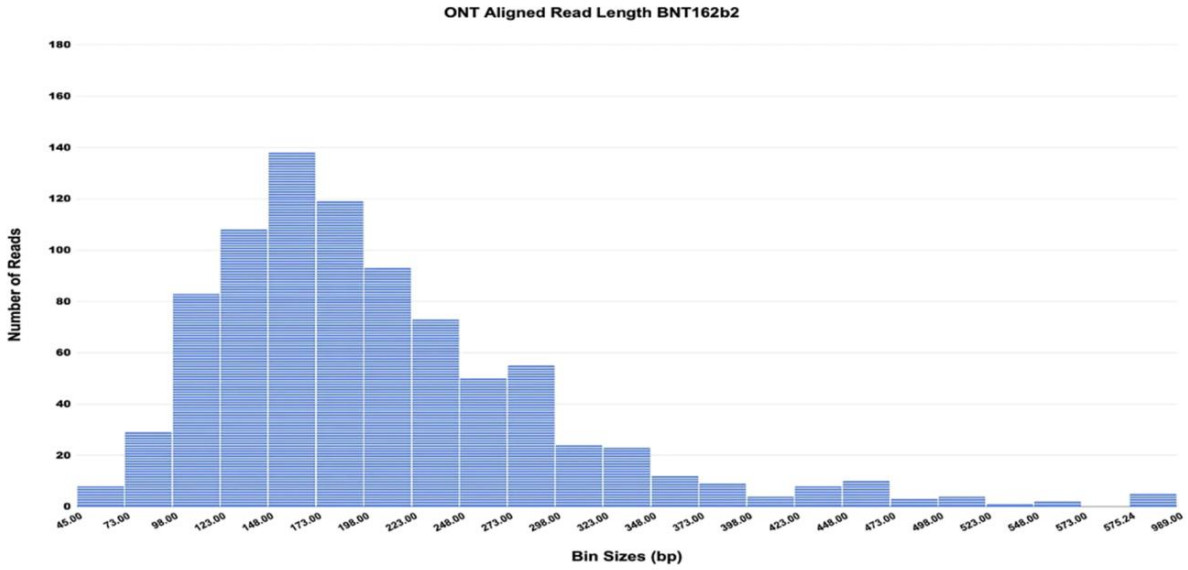
partierne. Disse data vedrørende vaccinehætteglas distribueret i Canada stemmer overens med adskillige ikke-fagfællebedømte og fagfællebedømte rapporter om DNA-kontaminering i modRNA-vacciner (McKernan, Buckhaults, Konig, Raoult, Kämmerer, Wang) [8,23-26].

Moderna havde den laveste DNA-koncentration ved qPCR, men den højeste koncentration med Qubit. Moderna-hætteglassene havde de mest ensartede niveauer af DNA mellem hætteglassene, hvilket tyder på en mere robust og standardiseret fremstillingsproces. I hvert hætteglas af Moderna-produktet, bortset fra lot AS0467D, udviste ori lavere mængder (Ct > 6) end spike, hvilket tyder på en mere effektiv fjernelse af vektor-DNA'et.

Machine Translated by Google



Figur 5. Grafisk sammenligning af rest-DNA-koncentration for spike (rød), ori (blå) og SV40 promoter-enhancer-ori (grøn) bestemt ved qPCR og total resterende DNA-koncentration i individuelle hætteglas som bestemt ved qubit®. I panel A er både Pfizer- og Moderna-data plottet i samme skala. Y-aksen blev justeret for at se alle prøver undtagen de tre SV40-promotor-enhancer-ori-resultater. Moderna-dataene er omsluttet af en rød boks og vises separat med en forstørret skala i panel B for at vise detaljer.

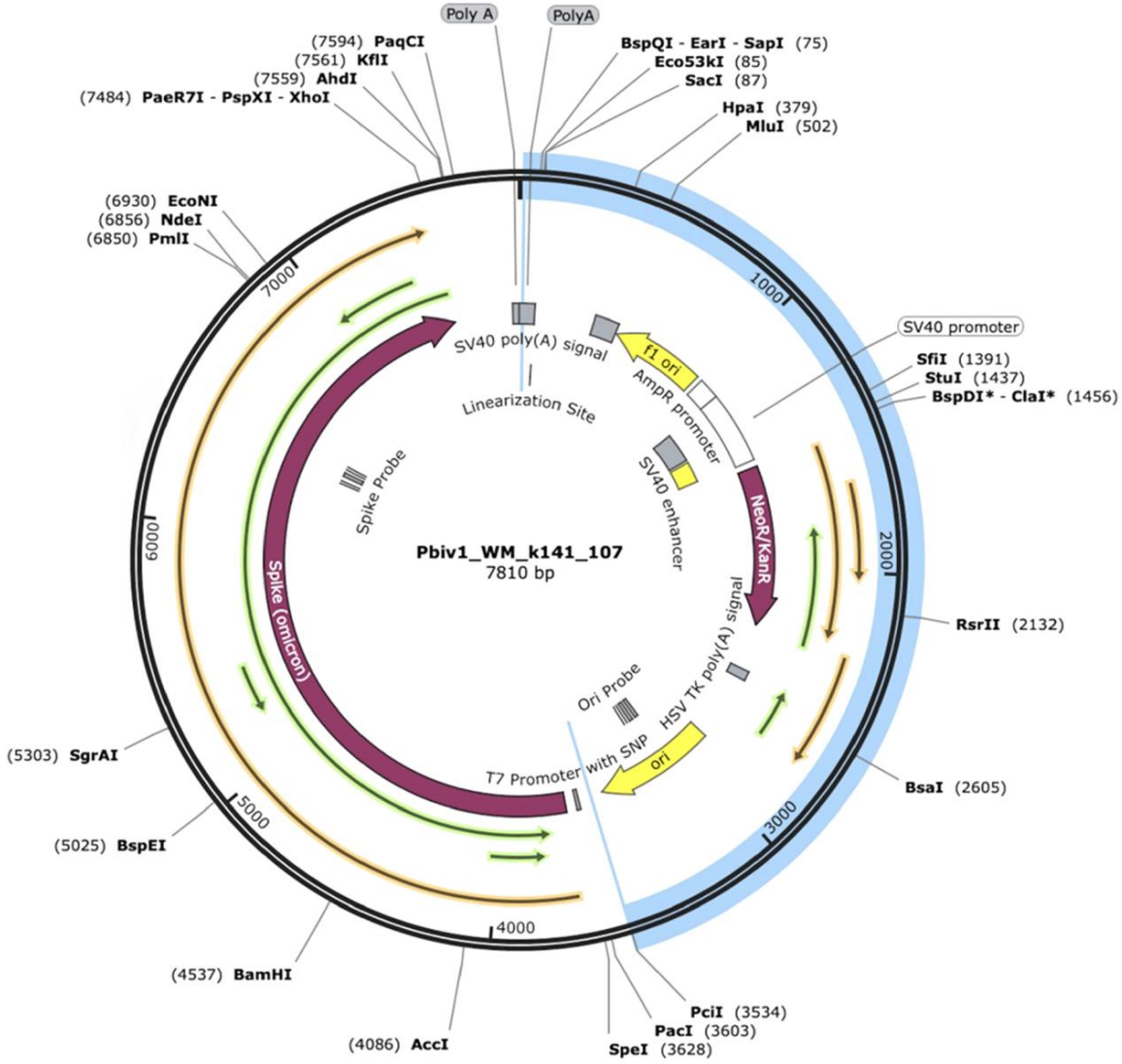


Figur 6. Oxford nanopore (ONT) læselængdefordelinger fra 865 læsninger kortlagt til vektorsekvensen (NCBI OR134577.1). Gennemsnit = 214 bp. Maks = 3,5 kb.

Muligvis kan homologt modificeret RNA forhindre fordøjelse af skabelon-DNA ved hybridisering [4].
Det er værd at bemærke, at AS0467D repræsenterer den bivalente BA.1-vaccine, som bestod af to separate LNP'er indeholdende forskellige renhedsgrader af mRNA, som blev blandet sammen i slutproduktet [27]. Da DNase I hæmmes af RNA-DNA-hybrider, kan de forskellige modRNA-konstruktioner udvise forskellig sekundær struktur eller hybridiseringspotentiale med DNA og ændre DNase I-aktivitet sammenlignet med andre Moderna-vacciner. Denne ekstreme forskel i de genetiske spike- og ori-mål peger på en produktionsvariation, der ikke burde eksistere, og understreger vigtigheden af, at regulatorerne ikke bør stole på et enkelt PCR-assay til at bestemme mængden af resterende plasmid-DNA i det endelige lægemiddelprodukt.

Hætteglassene med den højeste DNA-koncentration var fra to partier af Pfizer monovalente lilla hætteglas med en PBS-formulering og kræver fortynding før administration. Den 29. oktober 2021 godkendte den amerikanske FDA en ændring af formuleringen til en Tris/sukrose-buffer; den grå monovalente voksenvaccine og en orange vaccine til børn i alderen 6-11 år. Denne ændring blev foretaget for at øge stabiliteten, forenkle opbevaringskravene og for at give en brugsklar formulering [28,29].
Disse Pfizer-partier med lilla toppe var også forbundet med nogle af de højeste antal bivirkninger og alvorlige bivirkninger rapporteret i VAERS blandt alle de testede partier. Årsagen til denne forskel er ukendt, men

Machine Translated by Google

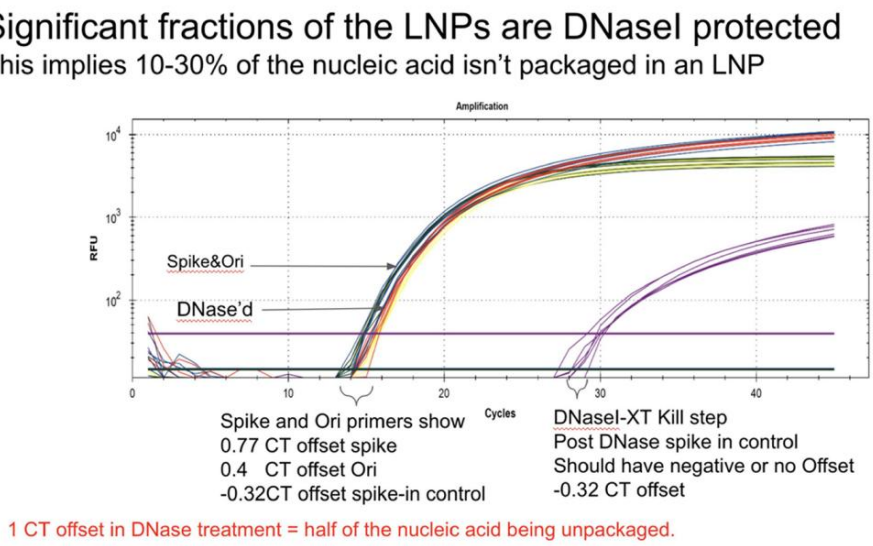


Figur 7. Den længste oxford-nanopore (ONT)-aflæsning justeres til vektorregionen vist med blåt. Placeringen af ori- og spike-primere er annoteret på den inderste cirkel. Åbne læserammer (ORF'er) er annoteret med guld- og grønne pile. Kanamycinresistensgener blev påvist i en meget overfladisk sekventeringsundersøgelse af vaccinen.

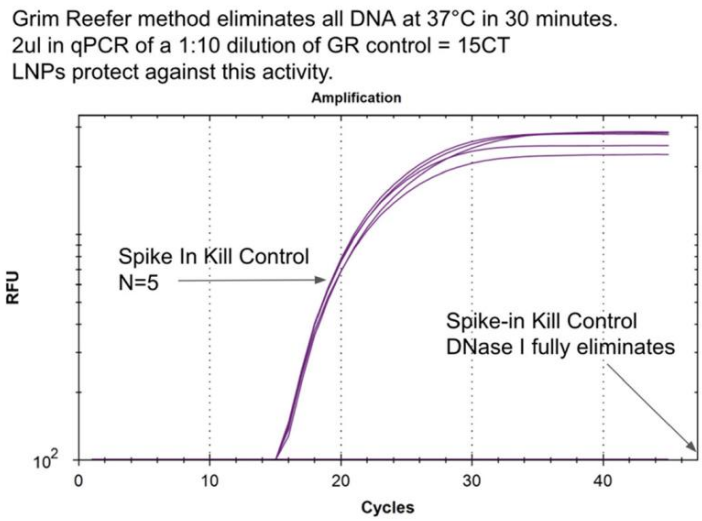
Brugen af PBS-buffer resulterede i synlige partikler i det endelige lægemiddelprodukt, som kan være forbundet med toksiciteter, herunder mikroembolier og inflammatoriske reaktioner [30]. Derudover blev der observeret lipidurenheder på grund af lipidhydrolyse og aldehyddannelse, hvilket resulterede i lipidaddukter, som kan have toksikologiske implikationer. Brugen af en Tris-buffer fungerer som en "aldehyddræn", der reducerer LNP-urenheder, som det er påvist af Moderna-forskere [31]. Addukter resulterer i tab af modRNA-funktion og kan påvirke mRNA's højere ordensstruktur, og ændringer i mRNA-kinetikken eller andre ukendte faktorer kan være ansvarlige [32].

Inter- og intra-lot variationen i resterende DNA fortsætter med at blive påvist, selv efter 3 års produktionserfaring. Denne fortsatte variation, især i Pfizer-hætteglassene, er måske mere fundamental end at opnå et lavt niveau af urenheder, da den demonstrerer en inkonsistent fremstillingsproces og sandsynligvis forekommer med andre proces- og produktrelaterede urenheder. DNase-renhed og robusthed kan variere mellem leverandører eller partier af DNase-enzymet [33]. Små forskelle i IVT-processen eller andre faktorer kan også spille en rolle i variationen af resterende DNA.
DNase-fordøjelsestrinnet i Pfizer/BioNTech-vaccinen var underlagt en anbefaling fra EMA for at forbedre metodens robusthed på godkendelsestidspunktet [34]. En FOIA indhentet i Tyskland viste imidlertid løbende problemer med ensartetheden af resterende DNA-niveauer inden for og mellem Pfizer/BioNTech-produktionssteder, brugen af interne "standarder" og mangel på

Machine Translated by Google



Figur 8. DNase I-XT-behandling af Pfizer-vaccinen viser nukleaseresistens af DNA'et i vaccinerne.



Figur 9. DNase I-XT positiv kontrol viser, at fordøjelsesassayet eliminerer alt tilsat DNA under de samme betingelser, der anvendes til at vurdere vaccinenukleasefølsomheden.

korrelation mellem DNase-enzymets aktivitet og resterende DNA hele 15 måneder efter godkendelse [35]. Dette viser, at de løbende bestræbelser på at fjerne DNA-fragmenter har haft begrænset succes.

Vores udforskende analyse af forholdet mellem rest-DNA-indholdet og SAE'er rapporteret til VAERS er foreløbig og begrænset i stikprøvestørrelse, men berettiger bekræftelse ved at undersøge mange flere partier og hætteglas. Denne foreløbige analyse synes at vise en korrelation mellem de bivirkninger, der er rapporteret for hvert parti, og DNA-niveauerne, især i forbindelse med ori. Yderligere testning af hætteglas fra andre uafhængige laboratorier, herunder prospektiv langtidsovervågning, er nødvendig for at bekræfte vores resultater og bekræfte, om der eksisterer en korrelation. Ved testning med qPCR udviste Pfizer lot FD0810, det ældste undersøgte Pfizer-parti, lavere niveauer af spike og SV40 promoter-enhancer-ori med sammenlignelige ori DNA-niveauer som andre monovalente hætteglas (med lilla toppe) hos voksne, men det var forbundet med de højeste rapporterede samlede bivirkninger i VAERS. Vi testede kun et enkelt hætteglas, som muligvis ikke repræsenterer hele partiet. Uden at kende partistørrelserne eller hvor mange personer, der modtog doser fra hvert parti, er det udfordrende at korrelere SAE'er til specifikke partier med datoen fra kun 16 partier. Hvis en mængde forbundet med høje SAE'er blev administreret til betydeligt flere personer, kunne det skævvride forholdet mellem SAE'er og person, hvilket yderligere komplicerer bestræbelserne på at etablere en klar korrelation. Vores resultater tyder dog på, at ud over

Machine Translated by Google

Plasmid-DNA-niveauer, problemer relateret til LNP'er, toksicitet, autoimmunitet og/eller afvigende immunresponser på grund af ribosomal frameshifting kan tilskrives bivirkninger, herunder komplementaktiveringsrelateret pseudoallergi (CARPA), og kan bidrage til bivirkninger kort efter vaccination [36-41]. Den tilfældige sammensætning af DNA-fragmenter i disse hætteglas komplicerer den direkte korrelation mellem plasmid-DNA-niveauer og specifikke bivirkninger, fordi de genotoksiske virkninger af hvert fragment varierer uforudsigeligt afhængigt af deres sekvens og interaktion med værtsgenomet. Denne variation gør det umuligt præcist at estimere bivirkninger udelukkende baseret på DNA-mængde. Højere DNA-mængder kan også bidrage til langsigtede sundhedsrisici, såsom kræft fra genomiske integrationshændelser. VAERS indfanger primært kortsigtede bivirkninger og kan underrapportere langsigtede virkninger. Yderligere hætteglastestning er nødvendig for at etablere en dosis-responskurve ved hjælp af VAERS-data. Langsigtet prospektiv overvågning er afgørende for at vurdere virkningen af genetiske vacciner, især da spike-proteinet er blevet detekteret op til 704 dage efter vaccination [42].

Der blev observeret forskellige sammenhænge for Moderna-partier for qPCR-data samt for plots baseret på rest-DNA estimeret ved fluorometri for både Pfizer- og Moderna-partier. Disse observationer kan afspejle forskelle mellem de to produkter, såsom dosisvolumen, mængde DNA, størrelsesfordelingen af DNA-fragmenter, sammensætningen og sekvensen af plasmidvektoren og sammensætningen af lipid-nanopartikler. Andre forskelle, både mellem de to produkter og mellem forskellige partier af hvert produkt, kan også bidrage til vores observationer. Disse forskelle omfatter variationer i niveauer af forurenende stoffer eller urenheder. En væsentlig kilde til urenhed er fragmenteret mRNA, for hvilket der er blevet foreslået flere toksikologiske mekanismer, såsom dets virkninger på miRNA-processer [43]. dsRNA er en anden type urenhed, der forekommer sekundært i forhold til T7 RNA-polymerasepromotoren. dsRNA kan inducere proinflammatoriske cytokiner [44] og er blevet antaget at bidrage til immuninflammatoriske reaktioner såsom myokarditis [45]. Lipopolysaccharider i celler fra endotoksin kan binde både S1- og S2-underenhederne af spike-proteinet, hvilket kan resultere i forstærkede inflammatoriske reaktioner [46].

Bredere stikprøveudtagning vil sandsynligvis afsløre større detaljer med hensyn til hændelsestyper, såsom død, samt sammenligninger med andre arbejder, såsom det, der er rapporteret af Schmeling et al., der rapporterede en korrelation mellem bivirkninger og forskellige vaccinepartinumre [47]. Ingen af de aktuelt undersøgte vaccinepartier blev inkluderet i Schmeling-undersøgelsen, og der er behov for mere arbejde for at forstå, om og hvordan denne DNA-kontaminering er relateret til bivirkninger.

Selvom SV40-forstærkeren fremmer nuklear målretning [16,48], er genomisk integration af DNA-fragmenter endnu ikke blevet påvist for COVID-19 modRNA-produkterne [49]. Det er dog kendt, at DNA-kontaminering kan udløse et uberettiget medfødt immunrespons og kan være pro-trombotisk, især for fragmenter med højt GC-indhold [50]. dsDNA kan også være en betydelig faktor i iskæmiske sygdomme, herunder slagtilfælde [51]. Cytosolisk DNA er også kendt for at udløse cGAS-STING, og kronisk stimulering af denne signalvej menes at være pro-onkogen [52]. Modernas amerikanske patent nr. 10.898.574 understreger også risikoen for insertionsmutagenese af resterende DNA i deres vacciner. Selvom der synes at være en sammenhæng mellem høj DNA-kontaminering og alvorlige bivirkninger, er der behov for mere forskning for at udvide stikprøvestørrelsen og belyse enhver potentiel mekanisme i spil.

Det er vigtigt at understrege, at da qPCR ikke kan kvantificere molekyler, der er mindre end amplikonets størrelse (105-114 bp), undervurderer qPCR det samlede DNA i hver vaccine. At qPCR ikke er i stand til fuldt ud at kvantificere resterende DNA i mRNA-vacciner, er beskrevet i Moderna patent nr. US 10.077.439. Det er vigtigt at understrege, at brugen af et enkelt amplikon til qPCR kan føre til 100 gange forskellige estimater i nogle vacciner. Spike-DNA'et i nogle Moderna-vacciner er ~100 gange mere udbredt (~6CT'er) end det ikke-spikede DNA, hvilket tyder på DNase I-hæmning med komplementært RNA [4].

Dette forklarer de store forskelle, vi har observeret i rest-DNA-niveauer estimeret ved qPCR sammenlignet med Qubit®-fluorometri, især mellem Pfizer- og Moderna-produkterne. De meget større værdier opnået for Moderna-produktet kan delvist skyldes det større dosisvolumen, men antyder også, at der er en højere andel af småt fragmenteret rest-DNA end i Pfizer-produktet. Dette er i overensstemmelse med et mere grundigt nukleasefordøjelsestrin. Dette illustrerer, at de retningslinjer for rest-DNA, der anbefales af FDA, er stærkt afhængige af de metoder, der anvendes til at kvantificere DNA'et. Desuden skal PCR-assayets robusthed og pålidelighed fastslås i betragtning af N-1-methylpseudouridins virkninger og tilstedeværelsen af RNA-DNA-hybrider.

Machine Translated by Google

Konig et al. fandt også høj DNA-kontaminering ved brug af Qubit®-fluorometri [24]. Dette studie manglede dog en RNase A-behandling og overvurderer sandsynligvis mængden af tilstedeværende DNA på grund af krydstale mellem DNA-specifikke farvestoffer, der interkalerer med RNA. Selvom specificiteten af disse DNA-specifikke fluorometriske farvestoffer er velpubliceret, vides der kun lidt om virkningen på deres specificitet, når de anvendes med prøver, der har høje koncentrationer af N1-methyl-pseudouridin modRNA eller GC-rig RNA, der er tilbøjelig til sekundær struktur og dannelse af mindre rille. Vores Qubit®-data viste, at der forekommer variation mellem prøveudtagning og fryse-optøningscyklusser. Denne variation kan skyldes den grove natur af de fluorometriske assays, fryse-optøningscyklusser eller på grund af prøveudtagningsfejl, især da prøvevortexing og gentagen pipettering kan introducere luftbobler, der vil ændre LNP-størrelsen og bundfældningen [53]. Vores RNase A-data viser imidlertid, at Qubit®-fluorometri skal kobles med fjernelse af vaccinens modRNA for korrekt at kvantificere det resterende DNA, når høje koncentrationer af RNA er til stede samtidigt.

Denne fluorometriske vurdering er af særlig interesse, da fluorometri og UV-spektrofotometri blev brugt til at kvantificere RNA i Pfizer COVID-19-vaccinerne, som beskrevet i EMA-dokumenter [7], mens qPCR blev brugt til at kvantificere DNA. Denne selektive brug af forskellige metoder til at kvantificere RNA/DNA-forhold kan føre til vidt forskellige resultater for de forholdsmetriske retningslinjer, der gælder hos EMA.

Denne forhøjede fluorometrikvantificering sammenlignet med qPCR-kvantificering er i overensstemmelse med ONT-læselængdefordelingerne, som også antyder, at en del af DNA'et kan være mindre end amplikonstørrelsen. Mens ONT-sekventeringsværktøjet detekterer molekyler kortere end 100 bp, bruger metoderne til bibliotekskonstruktion til ONT et 0,7X Ampure DNA-oprensningstrin, som drastisk selekterer imod oprensning af molekyler <150 bp i størrelse. Som et resultat er læselængdefordelingerne for ONT-læsninger skæve mod fragmenter >150 bp og er ikke en perfekt afspejling af de mindre fragmenter, der kan være til stede og undertalt af både ONT og qPCR.

Tilsvarende viser Georgiou et al., at fluorometriske farvestoffer producerer 70 % lavere signal efter DNase I-behandling, da farvestofferne giver et ikke-lineært signal for længere molekyler med samme DNA-masse [54]. Disse data er ikke blevet kompenseret for denne effekt og afspejler sandsynligvis en undervurdering af den faktiske mængde i det fluorometriske assay. Disse mindre DNA-molekyler går også ofte tabt under almindeligt anvendte DNA-isoleringsprocedurer såsom phenol/chloroform-oprensning eller ethanoludfældning. Kaiser et al. målte meget lavere mængder DNA i deres vacciner, men deres metoder fastslog ikke tabet af korte DNA-fragmenter efter flere ethanoludfældninger [55]. Da DNA-fragmenter <100 bp kan gå tabt under oprensningsmetoder, herunder ethanoludfældning, er det bedst at kvantificere det samlede DNA direkte på det endelige lægemiddelprodukt uden nogen oprensningstrin.

I øjeblikket anbefaler den amerikanske FDA producenter af virale vacciner at begrænse mængden af resterende DNA i det endelige produkt til under 10 ng/dosis for parenterale inokuleringer og størrelsen af DNA'et til under størrelsen af et funktionelt gen eller ~200 basepar [12]. Dette er også i overensstemmelse med anbefalinger fra Verdenssundhedsorganisationen (WHO) [20,56] og gælder for "nøgent" DNA, dvs. DNA, der ikke er forbundet med proteiner, lipider eller andre molekyler med henblik på beskyttelse eller pakning. Tidligere niveauer af rest-DNA blev sat af FDA til 10 pg/dosis i 1985. En WHO-studiegruppe i 1986 konkluderede, at risikoen er ubetydelig op til 100 pg/dosis, og i 1996 øgede WHO niveauerne yderligere op til 10 ng pr. dosis [20]. Da rest-DNA'et imidlertid er indkapslet i LNP'erne og transficeres effektivt direkte ind i celler, skal DNA-retningslinjerne for modRNA-vacciner revurderes.

FDA's og WHO's retningslinjer for tilladt DNA i vacciner er påvirket af arbejde udgivet af FDA-forskerne Sheng-Fowler et al. [57]. Dette arbejde fokuserede på kontaminering af genomisk DNA i værtsceller og bemærkede det øgede antal molekyler, der er til stede, når små virale vektorer er de kontaminerende arter. For disse kontaminanter med høj kopi pr. nanogram betragtes femtogrammer til attogrammer af DNA som ækvivalente med nanogrammer af cellesubstratgenomisk DNA. I betragtning af den korte fragmentstørrelse i modRNA-vaccinerne kan antallet af molekyler i hver dosis nå over 100 milliarder molekyler. Det resterende DNA i disse vacciner har et højt kopital og er rigt på promotorer, SV40-pattedyrsreplikationsorigins, ORF'er og nukleare målretningssekvenser. FDA's og WHO's retningslinjer tog ikke højde for pakning af DNA i lipid-nanopartikler, hvilket sandsynligvis resulterer i længere DNA-persistens samt øget transfektionseffektivitet. Desuden tog retningslinjerne ikke højde for

Machine Translated by Google

kumulativ dosering med LNP-baseret modRNA. Data har vist, at LNP'er er i stand til at øge RNA- eller DNA-celleindtrængen med 10-100 gange [58-60].

I Japan modtog 13 % af befolkningen syv doser COVID-19-vacciner med et boosterdosisinterval, nogle gange så kort som 2 måneder [61]. Desuden er risikoen ved kumulativ dosering fra vacciner, der er rettet mod andre infektioner, men bruger det samme plasmid og LNP-baserede modRNA-platform, ikke blevet taget i betragtning ved fastsættelsen af retningslinjerne for residual-DNA.

FDA-retningslinjerne er også skrevet til kun at kvantificere DNA-fragmenter på 200 bp eller mere, delvist fordi fragmenter mindre end dette ikke blev anset for at være i stand til at producere et funktionelt gen. Klinman et al. antyder dog, at fragmenter så små som 7 bp kan udgøre integrationsrisici [62]. Desuden kan retningslinjerne også have taget højde for, at fragmenter af nøgent DNA kortere end 200 bp ville blive hydrolyseret hurtigere af værtsnukleaseaktivitet end større molekyler [63].
Denne accelererede destruktion af vaccinerne kan ikke antages, da DNA'et er indkapslet og beskyttet af LNP'erne.

Klinman et al. bemærker også, at "ved evaluering af den potentielle skade ved plasmidintegration skal det bemærkes, at risikoen ved at introducere plasmider med stærke regulatoriske regioner i værtsgenomet langt overstiger den risiko, der er forbundet med tilfældige punktmutationer."

Endelig tager retningslinjerne ikke højde for, om det resterende DNA indeholder nukleare målretningssekvenser, replikationsorigins hos pattedyr og promotorer hos pattedyr, der findes i Pfizer-vaccinen [49].
Vacik et al. demonstrerede, at SV40-enhanceren i Pfizer-vektoren er en potent nuklear målretningssekvens, der viser lovende resultater inden for genterapi [48]. Senigl et al. demonstrerer, at SV40-enhanceren er et somatisk hypermutabilitetselement med tumorogent potentiale [64]. Endelig demonstrerer Drayman et al., at SV40-enhanceren i Pfizer-vaccinen binder sig til P53, hvilket minder os om, at de simple nanogramgrænser for resterende DNA skal genovervejes baseret på funktionaliteten og replikationskapaciteten af dette DNA [65].

Konklusion

Disse data demonstrerer tilstedeværelsen af milliarder til hundredvis af milliarder af DNA-molekyler pr. dosis i de testede modRNA COVID-19-produkter. Ved hjælp af fluorometri koblet med RNase A-fordøjelse oversteg alle testede produkter retningslinjerne for resterende DNA fastsat af FDA og WHO på 10 ng/dosis med 36-627 gange. qPCR-test viste, at alle Moderna-hætteglas var inden for den regulerende grænse, og at 3 Pfizer-hætteglas oversteg den regulerende grænse for SV40-promotor-enhancer-ori og viste meget større intra- og interbatch-variabilitet. qPCR undervurderer det samlede DNA, hvor resultaterne varierer meget afhængigt af det genomiske mål, hvilket understreger vigtigheden af at bruge mere end ét assay til nøjagtigt at bestemme DNA-belastningen. Det er vigtigt, at regulatorer udarbejder klare og konsistente retningslinjer for, hvordan man kvantificerer mRNA og plasmid-DNA i modRNA-vacciner. PCR-resultaterne for de seneste XBB.1.5 Moderna- og Pfizer-vacciner tyder på, at DNA-rester ikke er blevet reduceret i forhold til tidligere vaccineversioner.

Vores resultater udvider eksisterende bekymringer om vaccinesikkerhed og sætter spørgsmålstegn ved relevansen af retningslinjer, der blev udarbejdet før introduktionen af effektiv transfektion ved hjælp af LNP'er. Med flere åbenlyse begrænsninger opfordrer vi til, at vores arbejde replikeres under retsmedicinske forhold, og at retningslinjerne revideres for at tage højde for yderst effektiv DNA-transfektion og kumulativ dosering.

Dette arbejde fremhæver behovet for, at tilsynsmyndigheder og industrien overholder forsigtighedsprincippet og fremlægger tilstrækkelig og gennemsigtig dokumentation for, at produkter er sikre og effektive, og oplyser detaljerne om deres sammensætning og fremstillingsmetode.

Forfatterbidrag

Kredit: **David J. Speicher:** Konceptualisering, Datakuratering, Formel analyse, Undersøgelse, Metodologi, Projektadministration, Skrivning – originalt udkast, Skrivning – gennemgang og redigering; **Jessica Rose:** Formel analyse, Metodologi, Software, Skrivning – gennemgang og redigering; **Kevin McKernan:** Konceptualisering, Formel analyse, Undersøgelse, Metodologi, Ressourcer, Skrivning – originalt udkast, Skrivning – gennemgang og redigering.

Machine Translated by Google

Offentliggørelseserklæring

Kevin McKernan er ansat hos Medicinal Genomics og har stillet qPCR- og Qubit®-reagenser til rådighed gratis. Forfatteren(e) har ikke rapporteret nogen potentiel interessekonflikt.

Finansiering

Dette projekt blev selvfinansieret med reagenser leveret af Kevin McKernan.

ORCID

David J. Speicher http://orcid.org/0000-0002-1745-3263
Jessica Rose http://orcid.org/0000-0002-9091-4425
Kevin McKernan http://orcid.org/0000-0002-3908-1122

Erklæring om datatilgængelighed

FASTQ-fil til de kortlagte ONT-sekventeringsdata: https://mega.nz/file/UZhkiTBQ#8vjDK5JV5N5Dj2On34B6zdRO bEKGBy3ZC7w8q2t9UVc

Referencer

[1] de Fougerolles A, Elbashir SM. Levering og formulering af konstruerede nukleinsyrer. United States Patent and Trademark Office, Modernatx, Inc; 2021. https://patents.google.com/patent/US10898574B2/en, https://patentimages.storage.googleapis.com/29/f1/5c/fda42b8d8dd5ca/US10898574.pdf

[2] Guetzkow JA, Levi R. Effekten af mRNA-vaccinefremstillingsprocesser på effekt og sikkerhed er stadig et åbent spørgsmål. BMJ. 2023;378:o1731.

[3] Rabe I, Buff M, Ziegenhals N. In vitro-transkriptionsteknologier. United States Patent and Trademark Office; 2023. https://patentimages.storage.googleapis.com/03/aa/75/b6d7d2995c9653/US20230183769A1.pdf

[4] Sutton DH, Conn GL, Brown T m.fl. Afhængigheden af DNase I-aktivitet på konformationen af oligode-oxynukleotider. Biochem J. 1997;321(Pt 2):481–486. doi: 10.1042/bj3210481

[5] Thorn CR, Sharma D, Combs R m.fl. En livslang rejse - udvikling af Pfizers COVID-19-vaccine. Curr Opin Biotechnol. 2022;78:102803. doi: 10.1016/j.copbio.2022.102803

[6] Tinari S. EMA covid-19 datalækage, og hvad den fortæller os om mRNA-ustabilitet. BMJ. 2021;372:n627. doi: 10.1136/bmj.n627

[7] EMEA/H/C/005735/RR. Rapportørens rullende evalueringsrapport om kritisk vurdering: kvalitetsaspekter. Europæisk Lægemiddelstyrelsen; 2020. https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/

[8] McKernan K, Helbert Y, Kane LT m.fl. Sekventering af bivalente Moderna- og Pfizer mRNA-vacciner afslører mængder af ekspressionsvektor dsDNA pr. dosis fra nanogram til mikrogram. OSFio. 2023. doi: 10.31219/osf.io/b9t7m. https://osf.io/preprints/osf/b9t7m_v1

[9] Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D m.fl. Sikkerhedsovervågning i rapportering af bivirkninger ved vacciner. system (VAERS). Vaccine. 2015;33(36):4398–4405. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.035

[10] Speicher DJ, Rose J, Gutschi LM m.fl. DNA-fragmenter påvist i monovalente og bivalente Pfizer/BioNTech og Moderna modRNA COVID-19-vacciner fra Ontario, Canada: eksplorativ dosis-respons-sammenhæng med alvorlige bivirkninger. OSF Preprints; 2023. doi: 10.31219/osf.io/mjc97. https://osf.io/preprints/osf/mjc97_v1

[11] Det Internationale Harmoniseringsråd (ICH). Q6B: Specifikationer: Testprocedurer og acceptkriterier for bioteknologiske/biologiske produkter; 1999. Hentet fra https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Retningslinje.pdf

[12] Food and Drug Administration. Information om kemi, fremstilling og kontrol (CMC) til nye lægemiddelansøgninger (IND'er) inden for human genterapi. Det amerikanske sundhedsministerium; 2020. fra https://www.fda.gov/media/113760/download.

[13] Canadas sundhedsagentur. Nationalt vaccinekatalog: Vaccineparti. 2024. Hentet fra https://nvc-cnv.canada.ca/en/vaccine-lots

[14] VAERS Team. Standardprocedurer for COVID-19 fra Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) (pr. 29. januar 2021). Hentet fra https://www.cdc.gov/vaccinesafety/pdf/VAERS-v2-SOP.pdf-fil

[15] Port Hedland. Australien - dagsorden for ekstraordinært byrådsmøde - bilag 11. oktober 2024. Byrådet i Port Hedland; 2024. Hentet fra https://www.porthedland.wa.gov.au/council-meetings/

Machine Translated by Google

ekstraordinære-rådsmøder/ekstraordinært-rådsmøde-11-oktober-2024/247/dokumenter/vedhæftninger_scm_11102024.pdf-fil

[16] Dean DA, Dean BS, Muller S m.fl. Sekvenskrav for plasmidkerneimport. Exp Cell Res. 1999;253(2):713-722. doi: 10.1006/excr.1999.4716

[17] New England Biolabs. NEBioCalculator; 2023.

[18] R Development Core Team. R: R-projektet til statistisk databehandling. R Foundation for Statistical Databehandling; 2010. Hentet fra http://www.R-project.org

[19] Li H, Durbin R. Hurtig og præcis kortlæsningsjustering med Burrows-Wheeler-transformation. Bioinformatik. 2009;25(14):1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatik/btp324

[20] Shin J, Wood D, Robertson J m.fl. Uformel WHO-høring om anvendelsen af molekylære metoder til at sikre vacciners kvalitet, sikkerhed og effekt, Genève, Schweiz, 7.-8. april 2005. Biologicals. 2007;35(1):63–71. doi: 10.1016/j.biologics.2005.12.005

[21] Ban E, Kim A. PicoGreen-assay til kvantificering af nukleinsyrer - Anvendelser, udfordringer og løsninger. Anal Biochem. 2024;692:115577. doi: 10.1016/j.ab.2024.115577

[22] VAERS-teamet. Brugervejledning til VAERS-data; 2020. Hentet fra https://vaers.hhs.gov/docs/VAERSDataUseGuide_November 2020.pdf

[23] Senatet i South Carolina. Høring i Senatet i South Carolina - USC-professor Dr. Phillip Buckhaults; 2023.

[24] König B., Kirchner, JO Metodologiske overvejelser vedrørende kvantificering af DNA-urenheder i COVID-19 mRNA-vaccinen Comirnaty®. Methods Protoc. 2024, 7(41):1-8. doi: 10.3390/mps7030041

[25] Kämmerer U, Schulz V, Steger K. BioNTech RNA-baserede COVID-19-injektioner indeholder store mængder resterende DNA, inklusive en SV40-promotor/forstærkersekvens. Science, Public Health Policy and the Law, 5:1-22. Hentet fra https://publichealthpolicyjournal.com/biontech-rna-based-covid-19-injectioner-indeholder-store-mængder-af-rest-dna-inklusive-en-sv40-promotor-enhancer-sekvens/

[26] Wang TJ, Kim A, Kim K. En hurtig detektionsmetode for replikationskompetent plasmid-DNA fra COVID-19 mRNA-vacciner til kvalitetskontrol. J High School Sci. 2024;8(4):427–439. doi: 10.64336/001c.127890

[27] Det Europæiske Lægemiddelagentur. EMA/896245/2022: Vurderingsrapport for Spikevax. 2022. Hentet fra https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-hc-005791-ii-0075-g-epar-assessment-report-variation_en.pdf .

[28] Den amerikanske fødevare- og lægemiddelstyrelse (FDA). Nødgodkendelse (EUA) for en ikke-godkendt produktgennemgang. memorandum. 2021. Hentet fra https://www.fda.gov/media/153947/download

[29] Fødevare- og lægemiddelstyrelsen. Godkendelsesbrev; 2023. Hentet fra https://www.fda.gov/medier/150386/download

[30] Det amerikanske sundhedsministerium. Vejledning til industrien om inspektion af injicerbare produkter for synlige partikler, 2021. Hentet fra https://www.fda.gov/media/154868/download

[31] Packer M, Gyawali D, Yerabolu R m.fl. En ny mekanisme for tab af mRNA-aktivitet i lipid-nanopartikelleveringssystemer. Nat Commun. 2021;12(1):6777. doi: 10.1038/s41467-021-26926-0

[32] Hashiba K, Taguchi M, Sakamoto S m.fl. Overvindelse af termostabilitetsudfordringer i mRNA-lipid nanopartikelsystemer med piperidinbaserede ioniserbare lipider. Commun Biol. 2024;7(1):556. doi: 10.1038/s42003-024-06235-0

[33] Bushon RN, Kephart CM, Koltun GF, 3. m.fl. Statistisk vurdering af DNA-ekstraktionsreagenspartivariabilitet i kvantitativ PCR i realtid. Lett Appl Microbiol. 2010;50(3):276–282. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02788.x

[34] EMEA/H/C/005735/0000. Comirnaty European Public Assessment Report (EPAR). 2021. Hentet fra https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

[35] Det Europæiske Lægemiddelagentur. EMA/CHMP/50784/2022: type IB variationsrapport; 2022. Hentet fra https://postvac.org/wp-content/uploads/wpforo/attachments/3025/1252-Type-IB-variation-report.pdf

[36] Oldfield PR, Gutschi LM, McCullough PA m.fl. Pfizer/BioNTechs COVID-19 modRNA-vacciner: farlig genetisk virkningsmekanisme frigivet før tilstrækkelig præklinisk testning. J Am Phys Surgeons. 2024;29:118–126.

[37] Greenhawt M, Abrams EM, Shaker M m.fl. Risikoen for allergiske reaktioner på SARS-CoV-2-vacciner og anbefalet evaluering og behandling: en systematisk gennemgang, metaanalyse, GRADE-vurdering og international konsensustilgang. J Allergy Clin Immunol Pract. 2021;9(10):3546–3567. doi: 10.1016/j.jaip.2021.06.006

[38] Song J, Su D, Wu H m.fl. Implikationer af anafylaksi efter mRNA-LNP-vacciner: det er presserende at eliminere PEG og finde alternativer. Pharmaceutics. 2025;17(6):798. doi: 10.3390/pharmaceutics17060798

[39] Wiseman DM, Gutschi LM, Speicher DJ m.fl. Ribosomal frameshifting og fejllæsning af mRNA i COVID-19-vacciner producerer "off-target"-proteiner og immunresponser, der giver anledning til sikkerhedsproblemer: kommentar til britisk undersøgelse af Mulroney et al. OSF Preprints; 2023. Hentet fra 10.31219/osf.io/nt8jh

[40] Mulroney TE, Pöyry T, Yam-Puc JC m.fl. N1-methylpseudouridylering af mRNA forårsager +1 ribosomal rammeskift. Nature. 2024;625(7993):189–194. doi: 10.1038/s41586-023-06800-3

[41] Rubio-Casillas A, Cowley D, Raszek M m.fl. Anmeldelse: n 1-methyl-pseudouridin (m1ÿ): kræftens ven eller fjende? Int J Biol Macromol. 2024;267(Pt 1):131427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131427

[42] Bhattacharjee B, Lu P, Monteiro VS m.fl. Immunologiske og antigene signaturer forbundet med kroniske sygdomme efter COVID-19-vaccination. medRxiv. 2025. 2025.02.18.25322379; doi: 10.1101/2025.02.18.25322379

Machine Translated by Google

[43] Stati G, Amerio P, Nubile M m.fl. Bekymring omkring effektiviteten af mRNA-vaccinationsteknologi og dens langsigtede sikkerhed: potentiel interferens med miRNA-maskineriet. Int J Mol Sci. 2023;24(2):1404. doi: 10.3390/ijms24021404

[44] Nelson J, Sorensen EW, Mintri S m.fl. Indvirkning af mRNA-kemi og fremstillingsproces på aktivering af det medfødte immunforsvar. Sci Adv. 2020;6(26):eaaz6893. doi: 10.1126/sciadv.aaz6893

[45] Milano G, Gal J, Creisson A m.fl. Myokarditis og COVID-19 mRNA-vacciner: en mekanistisk hypotese, der involverer dsRNA. Future Virol. 2022, 17:191–196 doi: 10.2217/fvl-2021-0280

[46] Samsudin F, Raghuvamsi P, Petruk G, et al. SARS-CoV-2 spike-protein som et bakterielt lipopolysaccharid-leveringssystem i en overivrig inflammatorisk kaskade. J Mol Cell Biol. 2023;14: 1–14.

[47] Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Batchafhængig sikkerhed af BNT162b2 mRNA COVID-19-vaccinen. Eur J Clin Invest. 2023;53(8):e13998. doi: 10.1111/eci.13998

[48] Vacik J, Dean BS, Zimmer WE m.fl. Cellespecifik nuklear import af plasmid-DNA. Gene Ther. 1999;6(6):1006–1014. doi: 10.1038/sj.gt.3300924

[49] Lim S, Yocum RR, Silver PA m.fl. Høje spontane integrationsrater af endemodificerede lineære DNA'er ved transfektion af pattedyrceller. Sci Rep. 2023;13(1):6835. doi: 10.1038/s41598-023-33862-0

[50] Gaitzsch E, Czermak T, Ribeiro A m.fl. Dobbeltstrenget DNA inducerer en protrombotisk fænotype i vaskulært endotel. Sci Rep. 2017;7(1):1112. doi: 10.1038/s41598-017-01148-x

[51] Ma X, Xin D, She R m.fl. Ny indsigt i cGAS-STING-signalvejen ved iskæmisk slagtilfælde: fra præ- til efter sygdom. Front Immunol. 2023;14:1275408. doi: 10.3389/fimmu.2023.1275408

[52] Kwon J, Bakhoum SF. Den cytosoliske DNA-registrerende cGAS-STING-signalvej i kræft. Cancer Discov. 2020;10(1):26–39. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0761

[53] Matthessen R, Van Pottelberge R, Goffin B m.fl. Virkning af blanding og omrystning på mRNA-LNP-lægemiddelproduktets kvalitetsegenskaber. Sci Rep. 2024;14(1):19590. doi: 10.1038/s41598-024-70680-4

[54] Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protokol til kvantitativ vurdering af DNA-koncentration og -skade (fragmentering og hak). Nat Protoc. 2009;4(2):125–131. doi: 10.1038/nprot.2008.222

[55] Kaiser S, Kaiser S, Reis J m.fl. Kvantificering af objektive koncentrationer af DNA-urenheder i mRNA-vacciner. Vaccine. 2025;55:127022. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127022

[56] Verdenssundhedsorganisationen. Bilag 3: Krav til brug af dyrecellekulturer som substrater til fremstilling af biologiske lægemidler og karakterisering af cellebanker. Erstatning af bilag 1 i WHO's tekniske rapportserie nr. 878; 2013. Hentet fra https://cdn.who.int/media/docs/standardkilde/biologiske/dokumenter/trs_978_bilag_3.pdf

[57] Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. Problemer forbundet med resterende cellesubstrat-DNA i virale vaccines. Biologicals. 2009;37(3):190–195. doi: 10.1016/j.biologics.2009.02.015

[58] Di J, Du Z, Wu K m.fl. Biodistribution og ikke-lineær genekspression af mRNA LNP'er påvirket af leveringsvej og partikelstørrelse. Pharm Res. 2022;39(1):105–114. doi: 10.1007/s11095-022-03166-5

[59] Phua KK, Leong KW, Nair SK. Transfektionseffektivitet og transgenekspressionskinetik af mRNA leveret i nøgent og nanopartikelformat. J Control Release. 2013;166(3):227–233. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.029

[60] Turnbull IC, Eltoukhy AA, Fish KM m.fl. Myokardiel tilførsel af lipidoid nanopartikelbærende modRNA inducerer hurtig og forbigående ekspression. Mol Ther. 2016;24(1):66–75. doi: 10.1038/mt.2015.193

[61] Japans premierministers kontor. COVID-19-vacciner; 2024. https://japan.kantei.go.jp/ongoingtopics/vaccine.htm

[62] Klinman DM, Klaschik S, Tross D m.fl. FDA's vejledning om profylaktiske DNA-vacciner: analyse og anbefaling-anbefalinger. Vaccine. 2010;28(16):2801–2805. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.025

[63] André M, Reghin S, Boussard E m.fl. Universel realtids-PCR-analyse til kvantificering og størrelsesevaluering af resterende celle-DNA i humane virale vacciner. Biologicals. 2016;44(3):139–149. doi: 10.1016/j.biologics.2016.03.002

[64] Šenigl F, Soikkeli AI, Prost S m.fl. SV40-virusforstærkeren fungerer som et somatisk hypermutationsrettet element med potentiel tumorigen aktivitet. Tumour Virus Res. 2024;18:200293. doi: 10.1016/j.tvr.2024.200293

[65] Drayman N, Ben-Nun-Shaul O, Butin-Israeli V, et al. Forhøjet p53 i humane celler stopper SV40-infektion ved at hæmme T-ag-ekspression. Oncotarget. 2016;7(33):52643–52660. doi: 10.18632/oncotarget.10769